

Aus dem  
Rudolf-Zenker-Institut für Experimentelle Chirurgie  
der Universitätsmedizin Rostock  
Direktor: Prof. Dr. med. Brigitte Vollmar

# Analyse des therapeutischen Potentials von Resolvin D1 im murinen Modell der cholestatischen Leberfibrose



Inauguraldissertation  
zur Erlangung des akademischen Grades  
Doktor der Medizin  
der Universitätsmedizin Rostock

vorgelegt von  
Alexander Hartmann  
geboren am 27.02.1990 in Berlin  
Rostock, den 20.12.2018

Dekan: Prof. Dr. Emil Reisinger

1. Gutachter: Prof. Dr. med. Brigitte Vollmar, Universitätsmedizin Rostock
2. Gutachter: Prof. Dr. med. Georg Lamprecht, Universitätsmedizin Rostock
3. Gutachter: Prof. Dr. med. Alexander Wree, Universitätsklinikum Aachen

Tag der öffentlichen Verteidigung: 16.07.2019

*Die Endlosigkeit des wissenschaftlichen Ringens sorgt unablässig dafür,  
dass dem forschenden Menscheist seine beiden edelsten Antriebe erhalten bleiben  
und immer wieder von neuem angefacht werden: Die Begeisterung und die Ehrfurcht.*

*Max Planck*

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>4</b>
<b>3</b>	<b>Einleitung</b>	<b>5</b>
3.1	Leberfibrose . . . . .	5
3.1.1	Definitionen . . . . .	5
3.1.2	Epidemiologie . . . . .	7
3.1.3	Ätiologie . . . . .	10
3.1.4	Klinik und Diagnostik . . . . .	11
3.1.5	Pathogenese . . . . .	13
3.1.6	Therapieansätze . . . . .	17
3.2	Resolvine . . . . .	20
3.3	Zielsetzung . . . . .	23
<b>4</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>24</b>
4.1	Versuchstiere . . . . .	24
4.2	Praktische Anwendung . . . . .	24
4.2.1	Anästhesie . . . . .	24
4.2.2	Gallengangsligatur (BDL) . . . . .	25
4.2.3	Versuchsaufbau . . . . .	26
4.2.4	Blut- und Gewebeentnahme . . . . .	27
4.3	Untersuchungstechniken . . . . .	28
4.3.1	Vollblutanalyse . . . . .	28
4.3.2	Plasmaanalyse . . . . .	28
4.3.3	Histologie . . . . .	29
4.3.4	Immunhistochemie . . . . .	30
4.3.5	Western-Blot . . . . .	33
4.3.6	RT-PCR . . . . .	36

4.3.7	Multiplex-Zytokin-Analyse . . . . .	38
4.3.8	Statistik . . . . .	39
<b>5</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>40</b>
5.1	Allgemeinzustand . . . . .	40
5.2	Vollblutanalyse . . . . .	40
5.3	Leberschaden . . . . .	43
5.4	Inflammation . . . . .	46
5.5	Fibrose . . . . .	51
5.6	Proliferation . . . . .	55
<b>6</b>	<b>Diskussion</b>	<b>57</b>
6.1	Diskussion von Material und Methoden . . . . .	57
6.2	Diskussion der Ergebnisse . . . . .	62
6.3	Zusammenfassung und Ausblick . . . . .	69
<b>7</b>	<b>Thesen zur Dissertation</b>	<b>72</b>
<b>8</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>74</b>
<b>9</b>	<b>Abbildungsverzeichnis</b>	<b>91</b>
<b>10</b>	<b>Tabellenverzeichnis</b>	<b>94</b>
<b>11</b>	<b>Danksagung</b>	<b>95</b>
<b>12</b>	<b>Lebenslauf</b>	<b>96</b>
<b>13</b>	<b>Eidestattliche Erklärung</b>	<b>97</b>

# 1 Abkürzungsverzeichnis

AFLD	Alkoholische Fettlebererkrankung
AFP	$\alpha$ -Fetoprotein
ALT	Alanin-Aminotransferase
AP	Alkalische Phosphatase
AST	Aspartat-Aminotransferase
$\alpha$ -SMA	$\alpha$ -Smooth Muscle Actin
AUC	Area under the curve
BCA	Bicinchonicic Acid
BCLC	Barcelona Clinic Liver Cancer
BSA	Bovine Serum Albumin
BDL	Bile Duct Ligation
BrdU	Bromdesoxyuridin
CAE	Naphtol-AS-D-Chlorazetatesterase
CCl <sub>4</sub>	Tetrachlorkohlenstoff
CD	Cluster of Differentiation
CL	Clearance
CMKLR1	Chemokine-like Receptor 1
CTGF	Connective Tissue Growth Factor
DAB	Diaminobenzidin
DAMP	Danger Associated Molecular Pattern
DHA	Docosahexaensäure
DMN	Dimethylnitrosamin
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EMT	Epitheliale Mesenchymale Transition
EPA	Eicosapentaensäure
EZM	Extrazellulärmatrix
GAPDH	Glycerin-Aldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
gtt	Tropfen (Guttae)

---

<b>GPR</b>	<b>G-Protein-gekoppelter Rezeptor</b>
<b>HCC</b>	<b>Hepatozelluläres Karzinom</b>
<b>H.E.</b>	<b>Hämatoxylin Eosin</b>
<b>HRP</b>	<b>Horseradish peroxidase / Meerrettichperoxidase</b>
<b>HSC</b>	<b>Hepatische Sternzelle</b>
<b>ICD</b>	<b>International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems</b>
<b>IFN-<math>\gamma</math></b>	<b>Interferon-<math>\gamma</math></b>
<b>IL</b>	<b>Interleukin</b>
<b>i.p.</b>	<b>intraperitoneal</b>
<b>IPAF</b>	<b>ICE-Protease-Activating Factor</b>
<b>kDa</b>	<b>Kilodalton</b>
<b>KG</b>	<b>Körpergewicht</b>
<b>KIT</b>	<b>Rezeptor-Tyrosinkinase</b>
<b>LPS</b>	<b>Lipopolysaccharide</b>
<b>MAP</b>	<b>Mitogen-Activated Protein</b>
<b>MCP-1</b>	<b>Monocyte Chemoattractant Protein-1</b>
<b>MMP</b>	<b>Matrix-Metalloprotease</b>
<b>mRNA</b>	<b>messenger-RNA</b>
<b>NAFLD</b>	<b>Nicht-Alkoholische Fettlebererkrankung</b>
<b>NASH</b>	<b>Nicht-Alkoholische Steatohepatitis</b>
<b>NLR</b>	<b>NOD-like-Receptor</b>
<b>NLRP</b>	<b>NOD-like-Receptor-Protein</b>
<b>NOD</b>	<b>Nucleotide-Binding Oligomerisation Domain Like Receptors</b>
<b>NOS</b>	<b>Nitric Oxide Synthase</b>
<b>NACHT</b>	<b>Nucleotide-Binding Oligomerisation</b>
<b>N<sub>2</sub>O</b>	<b>Distickstoffmonoxid</b>
<b>O<sub>2</sub></b>	<b>Sauerstoff</b>
<b>PAF</b>	<b>Plättchenaktivierender Faktor</b>
<b>PAMP</b>	<b>Pathogen Associated Molecular Pattern</b>
<b>PBC</b>	<b>Primäre biliäre Zirrhose</b>

---

<b>PBS</b>	<b>Phosphatgepufferte Salzlösung</b>
<b>PCR</b>	<b>Polymerase-Kettenreaktion</b>
<b>PDGF</b>	<b>Platelet Derived Growth Factor</b>
<b>PRR</b>	<b>Pattern Recognition Receptor</b>
<b>PUFA</b>	<b>Poly Unsaturated Fatty Acid</b>
<b>raf</b>	<b>Proteinkinase (rapidly accelerated fibrosarcoma)</b>
<b>RFA</b>	<b>Radiofrequenzablation</b>
<b>RNA</b>	<b>Ribonukleinsäure</b>
<b>ROS</b>	<b>Reaktive Sauerstoff-Spezies</b>
<b>rpm</b>	<b>Umdrehungen pro Minute</b>
<b>RT</b>	<b>Reverse Transkription</b>
<b>Rv</b>	<b>Resolvin</b>
<b>TAA</b>	<b>Thioacetamid</b>
<b>TACE</b>	<b>Transarterielle Chemoembolisation</b>
<b>TGF-<math>\beta</math></b>	<b>Transforming Growth Factor <math>\beta</math></b>
<b>TIMP</b>	<b>Tissue Inhibitor of Metalloproteinases</b>
<b>TIPS</b>	<b>Transjugulärer intrahepatischer portosystemischer Shunt</b>
<b>TLR</b>	<b>Toll-like-Receptor</b>
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	<b>Tumornekrosefaktor-<math>\alpha</math></b>
<b>TRAIL</b>	<b>Tumor Necrosis Factor Related Apoptosis Inducing Ligand</b>
<b>VEGF</b>	<b>Vascular Endothelial Growth Factor</b>



## 2 Zusammenfassung

Chronische Lebererkrankungen stellen eine große medizinische Herausforderung unserer Zeit dar. Leberfibrose ist eine reversible Vorstufe der Leberzirrhose und des hepatozellulären Karzinoms, die rechtzeitig erkannt und therapiert werden muss. Aufgrund der zunehmenden Inzidenz chronischer Lebererkrankungen und unzureichend zugänglicher Therapiemöglichkeiten wächst auch deren sozioökonomische Belastung. In der Pathogenese der Leberfibrose spielt die hepatische Sternzelle (HSC) eine Schlüsselrolle. Durch die Aktivierung einer inflammatorischen Kaskade entsteht ein Ungleichgewicht zwischen Matrixsynthese und -abbau. Die initiale Inflammation stellt dabei ein geeignetes Target zur Verhinderung der Progression der Erkrankung dar. Resolvin D1 (RvD1) ist ein  $\omega$ -3-Fettsäure-Metabolit, für den viele therapeutische Eigenschaften in verschiedenen Krankheitsmodellen, wie z.B. der Nierenfibrose, beschrieben wurden.

In der vorliegenden Studie wurde untersucht, ob die tägliche Gabe von RvD1 Auswirkungen auf die inflammatorische und fibrotische Situation in Mäusen mit einer Gallengangs-ligatur-(BDL)-induzierten Leberfibrose hat. Zu drei verschiedenen Zeitpunkten nach BDL (2, 5 und 14 Tagen) wurde den Mäusen Blut und Leber entnommen und die Proben analysiert. Die Untersuchung umfasste neben histologischen und immunhistochemischen Färbetechniken auch molekularbiologische Untersuchungen wie RT-PCR, Western-Blot, sowie ein Multiplex-Zytokin-ELISA. In der vorliegenden Arbeit konnte die Ausbildung einer Leberfibrose durch die Behandlung mit RvD1 nicht verhindert bzw. gemildert werden. Dennoch ließen sich in der RvD1-behandelten Gruppe protektive Effekte beobachten, die jedoch nicht signifikant waren. So zeigten sich histologisch verminderte Mengen an Kollagen-1 $\alpha$ , eine geringere Proteinexpression von  $\alpha$ -SMA, geringere Werte des Cholestaseparameters AP und eine um 30 % erhöhte Makrophagenzahl in der F4/80-Färbung am 14. Tag. Die Ergebnisse der Studie beweisen die Komplexität der molekularen Pathophysiologie chronischer Lebererkrankungen und die Notwendigkeit der Forschung und Entwicklung weiterer wirksamer Substanzen, Forschungsmodelle und Therapieverfahren auf diesem Gebiet.

## 3 Einleitung

### 3.1 Leberfibrose

#### 3.1.1 Definitionen

Mit einem Gewicht von 1,5 bis 2 kg ist die intraperitoneal liegende Leber als zentrales Stoffwechselorgan lebensnotwendig (Schünke et al., 2012). Sie besteht aus einem linken (mit den Segmenten II und III) und einem rechten (mit den Segmenten I, IV-VIII) Leberlappen, getrennt durch das Ligamentum falciforme hepatis (Fried et al., 2013). Zytologisch ergibt sich ein buntes Bild aus Hepatozyten, Kupffer-Zellen, hepatischen Sternzellen (HSC), Ovalzellen, Pitzellen und Endothelzellen (Blum et al., 2018). Auch der histologische Aufbau zeichnet sich äußerst komplex und strukturiert sich auf der Ebene von Leberläppchen mit dem typischen Korrelat aus interlobulären Gallengängen, Ästen der Arteria hepatica und Vena portae (Glisson-Trias) (Fried et al., 2013).

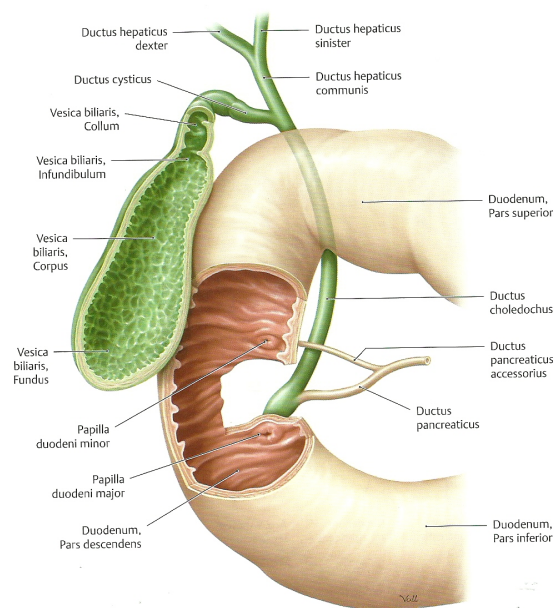


Abb. 1: Anatomie der Gallengänge (Schünke et al., 2012)

Hervorzuheben ist zudem der Aufbau des Gallensystems (Abb. 1): die von den Leberzellen produzierte Galle wird über intrahepatische Gallengänge, den Ductuli interlobulares bili-feri, transportiert, um sich zu einem rechten und linken Ductus hepaticus zu vereinigen.

Diese beiden bilden zusammen hinter der Leberpforte den Ductus hepaticus communis (Trigonum cholezystohepaticum/Calot-Dreieck). Die Gallenblase, die ein Reservoir für die nahrungsmittelabhängige Ausschüttung der Galle darstellt, mündet mittels Ductus cysticus gemeinsam mit dem Ductus hepaticus communis als Ductus choledochus über die Papilla duodeni major (Vateri) in den Dünndarm (Fried et al., 2013). Die Leber ist funktionell bedeutsam sowohl für den Glukose-, Fett- und Proteinstoffwechsel, als auch für die Hormonsynthese, die Speicherung von Eisen und fettlöslichen Vitaminen, die Biotransformation und nicht zuletzt für die Gallesekretion (Blum et al., 2018).

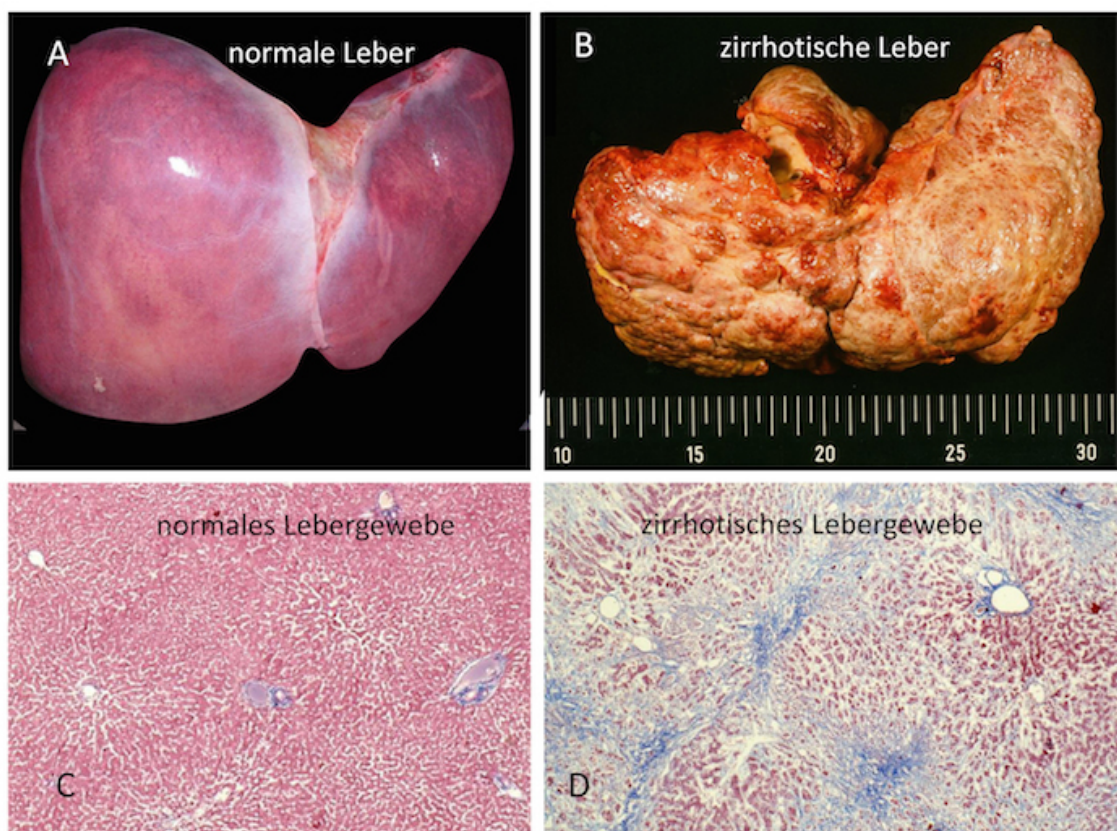


Abb. 2: Makroskopisch A) gesunde Leber, B) zirrhotische Leber,  
Mikroskopisch C) gesundes Lebergewebe, D) zirrhotisches Lebergewebe  
(Quelle: [http://www.medizin350.uni-kiel.de/entwurf/kupffer\\_komplettkupffer\\_entdeckungen.html](http://www.medizin350.uni-kiel.de/entwurf/kupffer_komplettkupffer_entdeckungen.html), 21.02.2018)

Bei der Leberfibrose handelt es sich um eine unkontrollierte Bindegewebsvermehrung, die potentiell reversibel ist und durch ein Ungleichgewicht zwischen Bildung (Fibrogenese) und Abbau (Fibrolyse) extrazellulärer Kollagene ausgelöst wird (Bataller und Brenner, 2005; Gressner et al., 2003; Herold, 2016). Die hepatischen Sternzellen (HSC) spielen bei der Pathogenese der Leberfibrose durch Ausschüttung vieler Zytokine eine entscheidende Rolle (Iredale, 2001). Es gibt zahlreiche histologische Varianten, so wird bei einer Fibrose rund um einzelne Zellen bzw. Zellgruppen von perizellulärer, beim Vorliegen vermehrter extrazellulärer Kollagene über den gesamten Leberlappen von diffuser Fibrose gesprochen, daneben sind die periportale, fokale, zonale und periduktale Form der Fibrose zu erwähnen (Anthony et al., 1978).

Von Leberzirrhose spricht man, wenn dieser Umbauprozess das gesamte Organ massiv befällt, sodass er irreversibel wird (Abb. 2). Histologisch wird die Diagnose durch den Nachweis zerstörter Leberläppchen und Gefäßstrukturen mit Faservermehrung, das Auftreten von zahlreichen Regeneratknoten, die Steigerung der bindegewebigen Steifigkeit und damit Schrumpfung des Organs (Anthony et al., 1978; Herold, 2016) gesichert. Daher wird die zirrhotische Leber auch als „Schrumpfleber“ bezeichnet. Etablierte histologische Scoring-Systeme für chronische Virushepatitiden sind der ISHAK- (0-6), METAVIR (F0-F4) (Meta-analysis of histologic data in viral hepatitis), Knodell-, Desmet und Scheuer-Score (Bataller und Brenner, 2005; Lörke et al., 2012; Takahashi, 2011).

Das hepatozelluläre Karzinom (HCC) ist der häufigste primäre Leberzelltumor, der als Endstadium einer Leberzirrhose, aber auch durch andere Ätiologien verursacht werden kann. Neben unifokalem und multifokalem Wachstum ist auch ein diffus infiltratives Wachstum bekannt. Diagnostisch wird das HCC durch das klinische Bild, Laborparameter (bei 50 % AFP erhöht) und Bildgebung gesichert (Fried et al., 2013; Herold, 2016).

### **3.1.2 Epidemiologie**

Chronische Lebererkrankungen gehören nach WHO-Angaben mit 500.000 Neudiagnosen pro Jahr auf Ebene der primären Leberzellkarzinome weltweit (Blachier et al., 2013) zu den häufigsten medizinischen Problemen unserer modernen Gesellschaft. Im Jahr 2010

verstarben ca. 4 % der Menschen zwischen 15 und 49 Jahren weltweit an einer Leberzirrhose (Lozano et al., 2012) (Abb. 3). Da das mittlere Erkrankungsalter für chronische Lebererkrankungen jenseits der 50 Jahre liegt, ist diese Zahl deutlich höher zu schätzen. In der Europäischen Union sterben jährlich 170.000 Menschen an den Folgen einer Zirrhose (Blachier et al., 2013), in Deutschland wurden im Jahr 2008 16.000 Patienten mit Leberzirrhose diagnostiziert und 8600 mit einer Form eines malignen Leberzelltumores (Kaatsch et al., 2015). Mit jährlichen Sterberaten von 8600 Menschen gehören Lebertumoren zu den 10 häufigsten tödlichen Krebserkrankungen in Deutschland. Die altersabhängige Inzidenzrate nimmt in der männlichen Bevölkerung in den letzten 10 Jahren um fast 30 % deutlich zu (Blachier et al., 2013). Zählt man zusätzlich die Vorstufe der Leberzellkarzinome, die Leberzirrhose, hinzu, so erhält man dramatische Erkrankungszahlen für Deutschland, die durch ihre Anzahl nur noch durch chronisch obstruktive Lungenerkrankungen und kolorektale Karzinome übertroffen werden (Blachier et al., 2013).

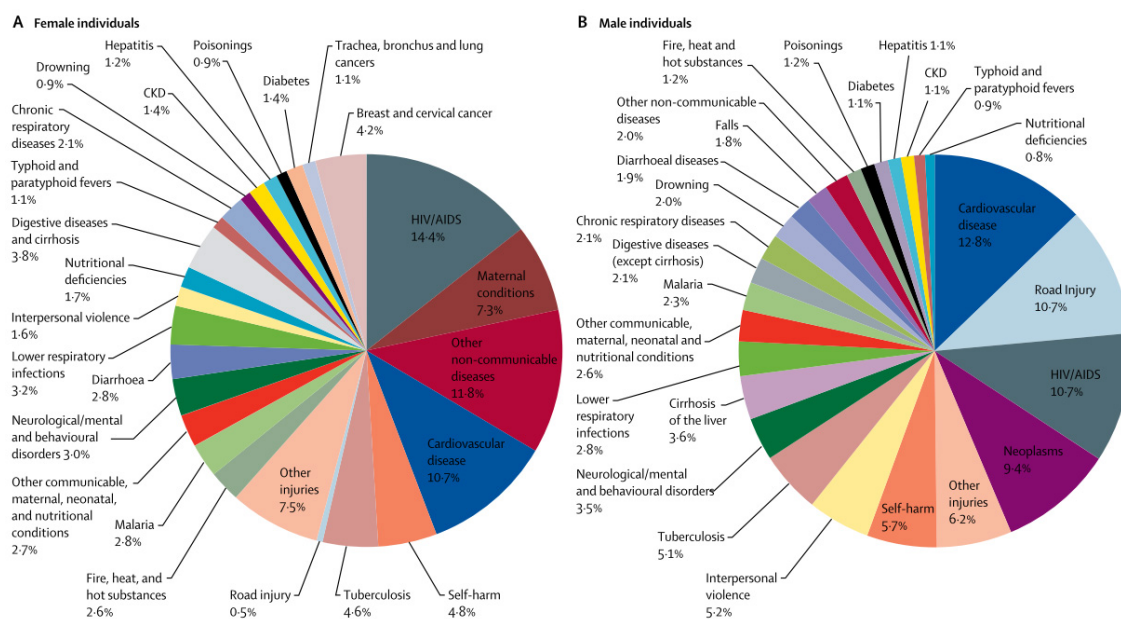


Abb. 3: Weltweite Todesursachen für Menschen zwischen 15-49 Jahren (Lozano et al., 2012)

Das männliche Geschlecht zeigt mit einem Erkrankungsverhältnis von 2:1 gegenüber den Frauen bei bösartigen Lebertumoren deutliche Dominanz. Das mittlere Erkrankungsalter liegt für Männer bei 71 Jahren und für Frauen bei 74 Jahren (Abb. 4). In Deutschland

wird einer von 84 Männern und eine von 200 Frauen im Laufe ihres Lebens an einem bösartigen Lebertumor erkranken (Kaatsch et al., 2015). Bei 66 % der bösartigen Lebertumore handelt es sich um ein HCC, 21 % gehen aus intrahepatischen Gallengangszellen als Cholangiokarzinom hervor. Die Prognose der Leberzelltumore ist äußerst schlecht: betrachtet man die 5-Jahres-Überlebenswahrscheinlichkeit manifester Leberzelltumoren, so zeigen sich bei Männern und Frauen Raten um 15 % (Kaatsch et al., 2015). In Europa

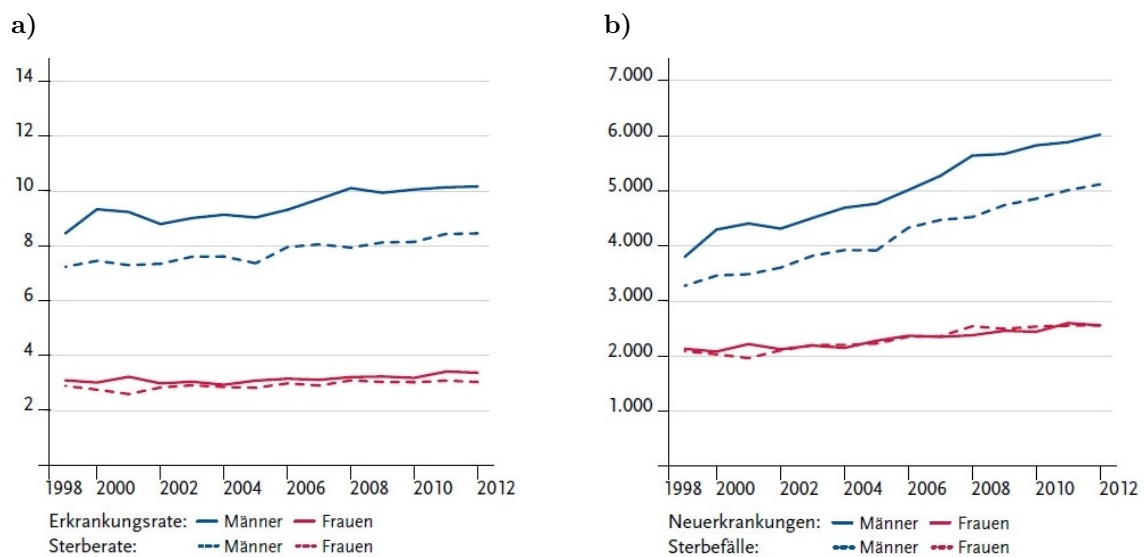


Abb. 4: a) Leberkrebs - Altersstandardisierte Erkrankungs- und Sterberaten (je 100.000),  
b) Leberkrebs - Absolute Zahl der Neuerkrankungs- und Sterbefälle,  
je nach Geschlecht, ICD-10 C22, Deutschland 1999-2012 (Kaatsch et al., 2015)

werden jährlich 5500 Lebertransplantationen durchgeführt (Blachier et al., 2013). Laut Eurotransplant wurden 2016 circa 1500 Lebern im Kooperationsgebiet, d.h. in den Staaten Deutschland, Österreich, Ungarn, Kroatien, Belgien, Niederlande, Luxemburg und Slowenien, transplantiert (Eurotransplant, 2016). Diese Zahl sollte alarmieren, da der Bedarf an effizienten Behandlungsmöglichkeiten damit nicht ansatzweise gedeckt wird. Die Forschung nach innovativen Heilungsmöglichkeiten, die eine frühzeitige Erkennung und Therapie fordern, stellen damit die Formel zum Erfolg bei der Behandlung chronischer Lebererkrankungen dar. Auf dem Weg zur Entstehung einer Leberzirrhose oder eines HCC nimmt die Leberfibrose eine Vorstufe ein, an der man therapeutisch ansetzen kann, um die Chronifizierung der Erkrankungen nachhaltig und effizient zu verhindern.



### 3.1.3 Ätiologie

Mehr als die Hälfte (55 %) aller Leberzirrhosen in den Industrieländern werden durch chronische Virushepatitiden B, C und D verursacht, 40 % haben einen Alkoholabusus als Grundlage (Herold, 2016). Weitere Ursachen können Stoffwechselerkrankungen wie Morbus Wilson,  $\alpha$ 1-Antitrypsin-Mangel, Hämochromatose, Mukoviszidose, aber auch die Autoimmunhepatitis, das Budd-Chiari-Syndrom oder die Primäre biliäre Zirrhose (PBC) sein. Auch eine Cholestase, also jegliche Störung der Gallensynthese oder -sekretion, die zum einen obstruktiv (z.B. durch Choledocholithiasis), zum anderen nicht-obstruktiv (z.B. durch Hepatitiden) intra- oder extrahepatisch auftreten kann, stellt eine entscheidende Ursache für die Entstehung chronischer Lebererkrankungen dar (Goeser, 2013). Bei einem Drittel aller Patienten mit einer alkoholischen Steatohepatitis (ASH) manifestiert sich eine Cholestase (Roeb et al., 2015). Zudem sei erwähnt, dass eine klare Trennung der Ätiologien voneinander nicht möglich ist, da meist mehr als ein Risikofaktor in der Erkrankungsgruppe zu finden ist bzw. diese sich z.T. gegenseitig im Sinne eines Circulus vitiosus bedingen. Die nichtalkoholischen Fettlebererkrankungen (NAFLD) laufen meist in drei Stadien ab: so findet sich zu Beginn eine reine Fettleber (NAFL, Steatosis hepatis), die von einer nichtalkoholischen Steatohepatitis (NASH) schließlich in einer mikronodulären Leberzirrhose endet (Herold, 2016). Diese Erkrankungen sind maßgeblich an der Entwicklung eines HCC beteiligt.

Ursache der NAFLD sind allen voran das Metabolische Syndrom und Diabetes mellitus Typ 2. Aber auch Medikamente wie Amiodaron oder eine langfristige Gabe von Glukokortikoiden, seltener auch der Zustand nach bestimmten Magen-Darm-Operationen können in eine NAFLD münden. Davon abzugrenzen sind die Alkoholischen Fettlebererkrankungen (AFLD). Die Prävalenz liegt in Westeuropa bei 5-10 %. Ein Drittel aller Lebererkrankungen der westlichen Welt werden durch Alkoholkonsum verursacht (Bergmann und Horch, 2002). Die toxische Grenze von Alkohol liegt bei Männern mit 40 g Ethanol pro Tag doppelt so hoch, wie die der Frauen (Herold, 2016). Wird diese überschritten, ist das Risiko eine chronische Lebererkrankung zu erleiden, deutlich erhöht. Europa ist die Region mit dem höchsten Alkoholkonsum weltweit (Blachier et al., 2013): über 20 % der über 15-

jährigen Europäer trinken mindestens einmal die Woche in stärkeren Episoden, gemessen als 50 g Alkohol bzw. fünf und mehr alkoholische Getränke pro Abend. Ein kritischeres Verhalten mit der in unserer Gesellschaft am besten integriertesten Droge wäre nicht nur in diesem Zusammenhang durchaus wünschenswert.

Die vier häufigsten mit Leberfibrose assoziierten Risikofaktoren sind Alter, männliches Geschlecht, Alkoholkonsum und positive HCV-Antikörper (Blum et al., 2018). Neben einer flächendeckenden HBV-Immunisierung sind somit die Einschränkung des Alkoholkonsums und die gesunde Ernährung die besten protektiven Faktoren. Diesen Effekt konnte man in den mediterranen europäischen Ländern beobachten, die in den 1970er Jahren eine der höchsten Inzidenzraten chronischer Lebererkrankungen aufwiesen und durch die oben genannten Schutzmaßnahmen einen deutlichen Abfall der Erkrankungszahlen seit 1990 zeigen konnten (Blachier et al., 2013). Verschiedene Erkrankungen, wie z.B. das Mamma-Karzinom sind allgegenwärtig fest in der Medizin und im Krankheitsbewusstsein der Gesellschaft verankert und ein wesentlicher Baustein von Screening- und Früherkennungsprogrammen. Auch die chronischen Lebererkrankungen, die ähnlich hohe Prävalenzen zeigen (Blachier et al., 2013), müssen mehr in den Fokus der abwendbaren Volkserkrankungen durch effiziente Aufklärung, Protektion und Früherkennung rücken!

### **3.1.4 Klinik und Diagnostik**

Eine Leberfibrose fällt klinisch meist nur durch Allgemeinsymptome wie Schwäche, Müdigkeit und einem diffusen Druckschmerz im rechten Oberbauch auf (Wasmuth et al., 2010). Es ist nahezu unmöglich, die Diagnose dieses Frühstadiums nur anhand des klinischen Bildes vorherzusagen. Diagnostisch erfolgt eine perkutane oder laparoskopische Leberpunktion, wodurch nach oben genannten Scoring-Systemen die Manifestation der Leberfibrose beschrieben werden kann (Herold, 2016). Allerdings ist hierbei zu bedenken, dass sich die Leberarchitektur in den Leberlappen stark unterscheiden kann und somit keine endgültige Aussage über das Erkrankungsstadium getroffen werden kann. Aus diesem Grunde werden in den letzten Jahren zunehmend nicht-invasive Techniken bevorzugt, bei dem direkte und indirekte Laborparameter wie Thrombozytenzahl, Transaminasen oder



spezielle Matrixproteine wie Kollagen IV oder MMP-2 bestimmt und als Scores zusammengefasst werden (Wasmuth et al., 2010). Weiterhin kann eine Fibrose mit Hilfe der transienten Elastographie oder in Kombination mit Sonographie oder Magnetresonanztomographie abgebildet werden. Dabei wird die Steifigkeit der Leber, die Rückschlüsse auf die Fibrosierung zulässt, durch einen Vibrationssender ermittelt (Blum et al., 2018; Iredale et al., 2017).

Die Leberzirrhose manifestiert sich neben den oben genannten Symptomen auch durch spezifische Zeichen. Neben Leberhautzeichen (Spider naevi, Palmar- und Plantarerythem, Leukonychie, Hautatrophie) sind Lacklippen, Lackzunge, Prurigo simplex, Dupuytren-Kontrakturen, ein palpatorisch konsistenzvermehrtes Organ, Hepatosplenomegalie oder spezielle Risikokonstellationen aus metabolischem Syndrom, Alkoholabusus und Zufuhr hepatotoxischer Substanzen typisch (Herold, 2016; Wiegand und Berg, 2013). Hormonelle Störungen des verringerten Testosteron- und erhöhten Östrogenspiegels äußern sich bei Männern durch den Verlust männlicher Sekundärbehaarung, Potenzstörungen, Hodenatrophie und Gynäkomastie. Bei Frauen treten Menstruationsstörungen auf (Herold, 2016; Manns, 2013; Pascher et al., 2013).

Diagnostisch ist hier neben der Bestimmung typischer Laborkonstellationen wie die einer Thrombozytopenie, einer Leberfunktionsstörung (Erniedrigung von Albumin, Cholinesterase, Quick) und einer hepatischen Entgiftung (Erhöhung des Bilirubins) ebenfalls die B-Mode-Sonographie, die Gastroskopie und die Leberbiopsie (Bataller und Brenner, 2005; Wiegand und Berg, 2013) zu nennen. Allerdings ist die Indikation zur Biopsie streng geregelt und nur bei unklarer Genese ohne mögliche Diagnosestellung mittels der anderen Verfahren erlaubt (Wasmuth et al., 2010). Als typisches Scoring-System zur Einschätzung bei schweren fibrotischen und zirrhotischen Prozessen kommt u.a. der APRI-Score („AST to Platelet Ratio Index“) zum Einsatz, bei dem der Quotient aus AST und Thrombozyten gebildet wird (Wiegand und Berg, 2013). Zudem erfolgt die Einteilung der Schwere der Leberzirrhose durch die Child-Pugh-Kriterien (Herold, 2016) in die Stadien A, B, C: die Kriterien setzen sich aus den Laborparametern Albumin, Bilirubin, Quick bzw. INR, Aszites in der Sonographie und dem Grad der Enzephalopathie zusammen.

Typische Komplikationen treten als Dekompensationszeichen des nicht eingestellten portalen Hypertonus sowie der progredienten Entzündung und Fibrosierung auf (Sauerbruch et al., 2013). Zu diesen zählen v.a. der Ikterus, die intestinale Blutung, Aszites, die Enzephalopathie und das hepatozelluläre Karzinom (Herold, 2016; Wasmuth et al., 2010). Ein Sklerenikterus als häufige Folge einer manifesten Cholestase ist ab Serumbilirubinwerten von 2 g/dl bzw. ein Hautikterus ab 3-4 g/dl sichtbar. Die intestinale Blutung von Ösophagusvarizen, entstehend durch die portale Hypertonie mit Herstellung veränderter Druckverhältnisse und Bildung von Umgehungskreisläufen vom Portalsystem aus, ist eine riskante Komplikation, die nicht selten tödlich endet. Neben der medikamentösen Blutstillung stehen die endoskopische Beseitigung und Ligatursetzung der Blutungsquelle bzw. Verhinderung von Rezidivblutungen durch Drucksenkung mittels transjugulärer intrahepatischer portosystemischer Shunts (TIPS) im Mittelpunkt des therapeutischen Managements (Manns, 2013; Sauerbruch et al., 2013). Aszites entsteht aufgrund des hohen portalvenösen Druckes, wodurch Transsudat in die freie Bauchhöhle diffundiert (Herold, 2016). Diuretika, Elektrolytsubstitutionen, Aszitespunktionen und Anlegen eines TIPS, der den portosystemischen Druckgradienten um 50 % senkt, stellen den Schlüssel zum Erfolg in der Therapie dar (Wasmuth et al., 2010). Die hepatische Enzephalopathie entsteht durch Bildung portosystemischer Shunts, wodurch neurotoxische Substanzen bei gleichzeitig verringerter hepatischer Entgiftungsleistung ins ZNS gelangen. Bei schlechter Prognose können somit Störungen von Bewusstsein, Gedächtnis, Kognition, motorischer Fähigkeiten und der Persönlichkeit entstehen (Sauerbruch et al., 2013). Als Präkanzerose endet die Leberzirrhose oft in einem HCC: diagnostisch wird es meist bei manifester Leberzirrhose mittels Tumormarkern wie  $\alpha$ 1-Fetoprotein und Bildgebung per CT oder MRT ergänzt (Herold, 2016).

### 3.1.5 Pathogenese

Es ist wichtig, die Fibrose nicht als ein alleinstehendes Krankheitsbild zu betrachten, sondern als einen Prozessschritt, der sowohl Ursache als auch Folge von Lebererkrankungen sein kann (Dropmann et al., 2016). Eine gesunde Leber zeichnet sich rosig (Abb.

2a), mit typischen Leberläppchen, Lebersinusoiden, Portal- und Zentralvenen ab. Durch ein Ungleichgewicht, z.B. in der hepatozellulären Triglyceridsynthese, verbunden mit einem Einschluss zahlreicher Fetttröpfchen, kommt es durch ein vermehrtes Angebot an freien Fettsäuren und Triglyceriden zur Entstehung einer Steatose. Eine Steatohepatitis entsteht daraufhin durch vermehrte Entzündungsreaktionen und den Einschluss von Mallory-Körpern. Sind die Ursachen der Entzündung und Einlagerung von EZM nicht beseitigt, kann eine Fibrose entstehen, welche die Grundlage einer Zirrhose mit zerstörter Läppchenstruktur und knotiger Regeneration darstellt sowie die Entstehung eines HCC begünstigt (Dropmann et al., 2016).

Die HSC machen 5-8 % aller Gesamtleberzellen aus und spielen eine Schlüsselrolle während der Fibrogenese (Arthur, 2000; Blum et al., 2018). Sie liegen im Disse-Raum den Endothelzellen der Sinusoide mit ihren sternförmigen Ausläufern netzartig an (Gressner et al., 2003). Physiologisch dienen die HSC als Vitamin-A- (90 % des Gesamtkörperspeichers) und Triglycerid-Speicher, sowie zur Regulation des Gefäßtonus der Sinusoide. Dies erreichen sie durch Differenzierung zu Myofibroblasten mit Aufbau eines kontraktionsfähigen  $\alpha$ -Smooth-Muscle-Aktin-( $\alpha$ -SMA)-Zytoskeletts (Iredale, 2001). Die Aktivierung der HSC im Rahmen der Fibrogenese erfolgt zum einen über benachbarte, geschädigte Hepatozyten, Kupffer-Zellen, Endothelzellen (Abb. 5) und deren Zytokinausschüttung, aber auch durch infiltrierende Blutzellen (Weiskirchen und Tacke, 2014).

Unabhängig von der Noxe oder Schädigung steht zu Beginn der Pathogenese der Leberfibrose ein uniformer Weg: ein entzündlicher Prozess. Bei dieser Inflammation werden durch Nekrose und Apoptose Zellen zerstört und pro-inflammatorische und pro-fibrogene Mediatorstoffe freigesetzt (Gressner et al., 2003). Auf molekularer Ebene spielen spezielle Rezeptoren eine essentielle Schlüsselrolle in der Erkennung dieser Stoffe und in der Etablierung der Inflammation: NOD-like-Rezeptoren (NLRs) sind charakterisiert durch eine zentrale Nukleotidbindungs- und -oligomerisations-Domäne (NACHT) und gehören zur Gruppe der Pattern-recognition-Rezeptoren (PRRs), die im Vergleich zu den Toll-like-Rezeptoren (TLRs) nicht membrangebunden, sondern frei im Zytosol agieren (Schroder und Tschopp, 2010). Die PRRs reagieren in Zusammenarbeit mit den TLRs emp-

findlich auf spezielle Gefahr-anzeigende Moleküle (PAMP und DAMP) (Schroder und Tschopp, 2010). Durch die Etablierung der klassischen Entzündungskaskade kommt es zur Aktivierung von Kupffer-Zellen und zur Einwanderung von Immunzellen wie CD-4-T-Lymphozyten, Granulozyten, Thrombozyten und Monozyten. Durch zahlreiche Zytokine wie IL-1 $\beta$  oder IL-18 erfolgt die para- und autokrine Aktivierung von HSC zu profibrogenen Myofibroblasten, u.a. über das NLRP3-Inflammasom (Schroder et al., 2010; Wei et al., 2014; Wree et al., 2014).

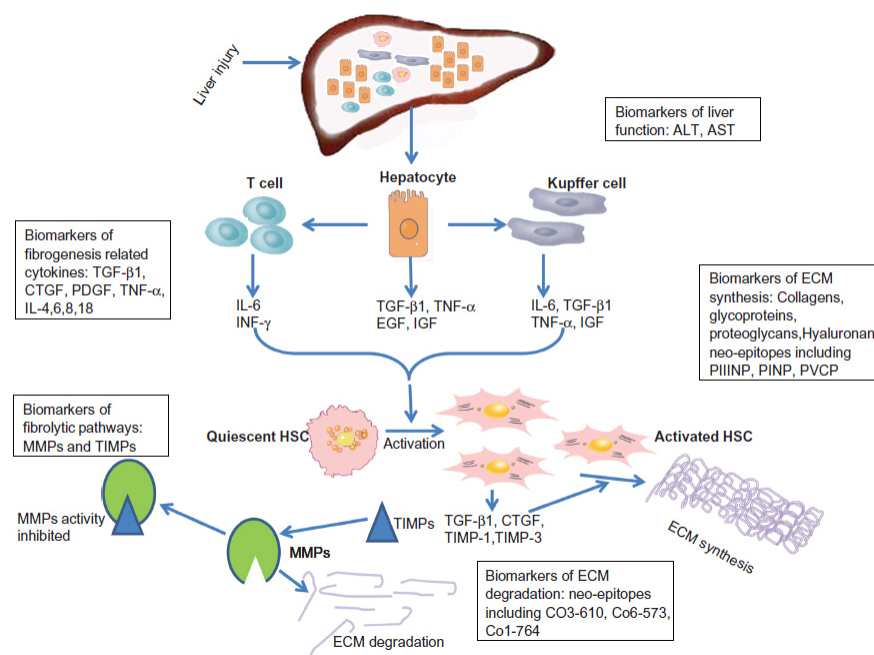


Abb. 5: Pathophysiologie der Leberfibrose (Liu et al., 2012)

Entscheidend im Prozess der Inflammation sind zudem Makrophagen. Derzeit sind die Typen M1- und M2a, b und c bekannt (Mareninova et al., 2015; Novak und Koh, 2013). Die M1-Subklasse wird durch IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  und LPS aktiviert und zeichnet sich durch pro-inflammatorische Eigenschaften aus. Sie schütten große Mengen von Zytokinen, Chemokinen und Adhäsionsmolekülen, wie z.B. IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-12, IL-18, PDGF-bb, TNF- $\alpha$ , Stickstoff- und Sauerstoff-Radikale aus (Liu et al., 2012; Novak und Koh, 2013; Schuppan et al., 2001). Profibrotische M1-Makrophagen produzieren ihre eigenen Matrix-Metalloproteasen (MMPs) und Tissue Inhibitors of Metalloproteinases (TIMPs) und regulieren damit, zusätzlich zu den HSC, die Rekrutierung pro-inflammatorischer Zellen sowie den

EZM-Umsatz (Murray und Wynn, 2011). Dem gegenüberstehend handelt es sich bei den M2-Makrophagen um eine sehr viel heterogenere Gruppe mit drei Unterklassen, die Bedeutung bei der anti-Inflammation haben und eine ausgeprägte Phagozytose, aber kaum Antigenpräsentation zeigen. Aktiviert werden sie durch IL-4 und IL-13. Eine starke Expression ihrerseits von TGF- $\beta$  und IL-10 ist bekannt (Novak und Koh, 2013). Zahlreiche Studien haben zudem gezeigt, dass ein Wechsel vom M1- zum M2-Phänotyp möglich ist und die einzelnen Populationen in ihrem Verhältnis zueinander sensibel auf Stoffwechselveränderungen reagieren (Novak und Koh, 2013; Stout et al., 2005; Stout und Suttles, 2004).

Liegt chronischer Stress vor, sodass die akute Schädigung durch Reparaturprozesse nicht beseitigt werden kann, werden die HSC dazu angeregt, ihren ruhenden Phänotyp zu verlassen, ihre Vitamin-A-Speicher zu verlieren und kontraktile Eigenschaften zu entfalten (Liu et al., 2012; Tacke et al., 2010). Durch die vermehrte Expression von TGF- $\beta$ , CTGF und TIMPs werden u.a. MMPs gehemmt und gleichzeitig die Matrix-Synthese gesteigert (Bataller und Brenner, 2005; Liedtke et al., 2013; Liu et al., 2012). Durch die Störung in diesem Gleichgewicht überwiegt die Nettosynthese und intrahepatische Deposition der Matrixproteine, allen voran von Kollagen Typ 1 $\alpha$  und III (Liu et al., 2012). Die Verteilung der EZM findet sich bei cholestatischen Erkrankungen und chronischen Virushepatitiden v.a. um die portalen Bereiche, während ASH sich eher perizentral und perisinusoidal formiert (Bataller und Brenner, 2005). Auch andere Zelltypen sind direkt an dieser Gewebeumstrukturierung beteiligt: so zeigen portale Fibroblasten, Hepatozyten, aus dem Knochenmark einwandernde Fibrozyten und hämatopoetische Stammzellen ebenfalls ein fibrogenes Potential. Diese Zellen können über den Prozess der epithelialen mesenchymalen Transition (EMT) direkt zu Myofibroblasten differenzieren (Bataller und Brenner, 2005; Tacke et al., 2010). Zum anderen sind Gallengangszellen und Hepatozyten an der Aktivierung von Kupffer-Makrophagen und somit an der Etablierung der Inflammation beteiligt (Bataller und Brenner, 2005; Tacke et al., 2010). Blum et al. (2018) beschreiben zusammenfassend fünf Phasen der HSC-Aktivierung als Circulus vitiosus, unabhängig von der Art der zugrunde liegenden Schädigung:

1. Proliferation: Zunahme der HSC durch autokrine Stimulation als Antwort auf mitogene Zytokine, wie PDGF.
2. Fibrogenese: Kupffer-Zellen sezernieren TGF- $\beta$ , das zur Aktivierung von HSC und damit zur Erhöhung der EZM-Produktion führt.
3. Kontraktilität: Endothelin-1 und NO, von den HSC sezerniert, sorgen für Vasokonstriktion und regulieren den sinusoidalen Gefäßtonus.
4. Chemotaxis: durch Chemokine, wie PDGF oder CCL<sub>2</sub> angelockt, wandern die HSC gezielt in bestimmte Zonen der Leberläppchen ein und stimulieren sich gegenseitig.
5. Matrixdegeneration und Fibrolyse: MMPs und TIMPs sorgen mit Hilfe von Makrophagenpopulationen für einen dynamischen Umbau der EZM. Dieser ist bei Heilung der Erkrankungsursache potentiell reversibel. Die HSC werden dabei durch Seneszenz und Apoptose ausgeschaltet.

In der Folge resultiert eine Bindegewebsvermehrung im Disse-Raum, was eine Störung der Leberarchitektur, aber auch der Leberfunktion nach sich zieht. Bestehen diese Störungen dauerhaft, so behindert die vermehrte Matrixanreicherung sowohl die Ausbildung von Pseudobasalmembranen und die Abnahme der endothelialen Fenestrierung im subendothelialen Disseraum, was zu einem gestörten Stoffaustausch zwischen Blut und Hepatozyten führt (Blum et al., 2018). Durch die so gesteigerte hämodynamische Resistenz der Leber kommt es zur Ausbildung von Kollateralkreisläufen zwischen Pfortader und V. cava superior, was letztlich zu lebensbedrohlichen Komplikationen wie der Ruptur ösophagealer Varizen, aber auch zum Fehltransport von neurotoxischen Substanzen ins ZNS bei gleichzeitig herabgesetzter Entgiftungsfunktion im Sinne einer hepatischen Enzephalopathie führen kann (Sauerbruch et al., 2013).

### 3.1.6 Therapieansätze

Die Therapie der Leberzirrhose richtet sich in erster Linie an die Behandlung der Grundkrankheit. Dementsprechend kann das Vermeiden der Noxe, eine Immunsuppression bei

Autoimmunhepatitis, eine antivirale Therapie bei Virushepatitiden, die Eisenentfernung bei Hämochromatose oder die Kupfereliminierung bei M. Wilson zielführend sein (Herold, 2016). Unterstützt werden sollte dies durch Allgemeinmaßnahmen wie Alkoholverbot, Verzicht lebertoxischer Medikamente, eine ausreichende Kalorien- und Eiweißzufuhr, sowie die Substitution der fettlöslichen Vitamine (A, D, E, K) und Elektrolyte (Wasmuth et al., 2010). Neben der Behandlung von Komplikationen ist eine regelmäßige Diagnostik zur Früherkennung eines HCC durch eine sonografische abdominelle Bildgebung und die Bestimmung des  $\alpha$ -Fetoproteins alle sechs Monate von entscheidendem prognostischen Wert (Herold, 2016). Behandlungsmöglichkeit per ultima ratio liefert die Lebertransplantation (Gressner et al., 2003). Die Therapie des HCC orientiert sich an dem Barcelona-Clinic-Liver-Cancer-(BCLC)-System, in das v.a. klinische Parameter wie die portale Hypertonie, die Tumorausdehnung, der Grad der Leberdekomensation (Child-Pugh-Stadium) und der Allgemeinzustand einfließt (Sauerbruch et al., 2013). Danach kann in den BCLC-Stadien 0 und A eine kurative Therapie mit Hilfe von Leberresektion, Transplantation und Radiofrequenzablation (RFA) mit 40-70 % 5-Jahres-Überlebenszeit erreicht werden (Wasmuth et al., 2010). In den fortgeschrittenen Stadien B und C wird mittels transarterieller Chemoembolisation (TACE) und Tyrosinkinaseinhibitoren eine palliative Therapie mit 50 % 5-Jahres-Überlebenszeit angestrebt (Sauerbruch et al., 2013). Im Endstadium D erfolgt eine palliative, symptomatische Therapie.

Grundsätzlich ist der Anspruch an neue Therapien die potentiell höchste Effektivität bei hoher Spezifität und zugleich möglichst geringen Nebenwirkungen zu erzielen. Ein therapeutischer Ansatz, der auf die direkte frühzeitige kurative Behandlung der Fibrose abzielt, ist bislang nicht bekannt (Tacke et al., 2010). Seit der Aufklärung zellulärer und molekularer Pathomechanismen sind zahlreiche neue Therapieansätze denkbar (Abb. 6): so gibt es zahlreiche Studien mit erfolgsversprechenden Molekülen wie IL-10, Interferon- $\gamma$  oder Angiotensin-II-Blockern (Wasmuth et al., 2010). Neue molekulare Strategien erfordern eine Langzeit-Beobachtung, um eine Remission beobachten bzw. Rezidive frühzeitig erkennen und erfolgreich behandeln zu können (Sauerbruch et al., 2013). Ein molekularbiologischer Ansatz auf Ebene der direkten Beeinflussung der HSC wäre innovativ und eine sinn-

volle Ergänzung zur Behandlung der Grundkrankheit, um eine fortschreitende Fibrosierung, Zirrhose oder gar die Entstehung eines HCC aufzuhalten. Wie unsere Arbeitsgruppe

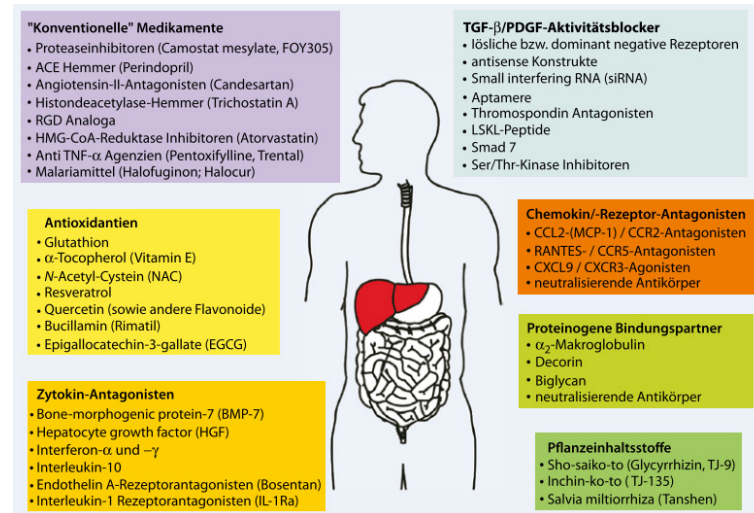


Abb. 6: Potentielle Therapieansätze bei Leberfibrose (Tacke et al., 2010)

Abshagen et al. (2015) bereits zeigte, konnte durch die si-RNA-vermittelte Hemmung des Forkhead-Box-(Fox)f1-Gens, ein wichtiger Transkriptionsfaktor für die HSC-Aktivierung, eine signifikante Reduktion der Kontraktion und Proliferation von HSC *in vitro* sowie im Tiermodell beobachtet werden. Somit stellen Gene, welche die HSC-Aktivierung fördern oder inhibieren, potentielle Targets in der Therapie chronischer Lebererkrankungen dar! Zudem zeigen vielversprechende diätische Studien durch Supplementierung ungesättigter  $\omega$ -3- und  $\omega$ -6-Fettsäuren, die in Säugetieren nicht de-novo gebildet werden können, protektive Effekte auf zahlreiche systemische Erkrankungen wie Colitis (Hudert et al., 2006), Pankreatitis (Weylandt et al., 2008) und chronische Lebererkrankungen (Rius et al., 2014). Es wurde festgestellt, dass ein Ungleichgewicht zwischen diesen beiden ungesättigten Fettsäuren zugunsten der  $\omega$ -6-Fettsäuren zu einer Aktivierung von Lipidmediatoren und einer Etablierung von Inflammation und Fibrogenese führen kann, die letztlich zahlreiche metabolische Erkrankungen begünstigen (Deutsche Gesellschaft für Ernährung e.V., Bonn, 2015; Gonzalez-Periz et al., 2009). Eine Supplementierung dieser Fettsäuren, die in einem veränderten, optimalen Verhältnis zueinander resultiert, könnte einen Erfolg in der Behandlung chronischer Lebererkrankungen erzielen.



### 3.2 Resolvine

Resolvine sind die wichtigsten  $\omega$ -3-Fettsäure-Metabolite, die physiologisch im menschlichen Organismus vorkommen. Mehrfach ungesättigte Fettsäuren (PUFA = poly unsaturated fatty acids) werden durch die Nahrung v.a. durch Fisch und Pflanzenöle aufgenommen und in den Phospholipiden unserer Zellmembranen allen voran in Hirn, Herz und Hoden gespeichert (Herold, 2016; Leaf et al., 2003). Für Resolvine ist bekannt, dass diese aktiv an der Regulation von Entzündungsprozessen im Sinne der Auflösung der Inflammation beteiligt sind (Bannenberg und Serhan, 2010; Ji et al., 2011). Derzeit sind zwei Klassen der Resolvine beschrieben: aus der Docosahexaensäure werden die Resolvine der D-Gruppe synthetisiert (Abb. 7). Aus der Eicosapentanoensäure entstehen jene der E-Gruppe. Die Synthese erfolgt über Lipoxygenasen und Cyclooxygenasen (Abb. 7). Forschungsergebnisse ernährungswissenschaftlicher Studien beweisen einen langfristigen Schutz vor Stoffwechselerkrankungen wie Arteriosklerose, Adipositas, Diabetes mellitus, Herzinfarkt, Schlaganfall und Lebererkrankungen durch eine erhöhte Zufuhr von  $\omega$ -3-Fettsäuren (Deutsche Gesellschaft für Ernährung e.V., Bonn, 2015). Neben den Resolvinen spielen auch Maresine, Protektine und Lipoxine eine entscheidende Rolle bei der Auflösung von Inflammationen. Im Gegensatz dazu stellen Prostaglandine, Thromboxane und Leukotriene einen wichtigen Bestandteil bei der Entstehung einer Inflammation dar (Friedman und Serhan, 2011; Serhan et al., 2002). In der vorliegenden Arbeit wird der Fokus auf das Resolvin D1 (RvD1) gelegt. Pharmakokinetisch zeichnet sich RvD1 durch folgende Eigenschaften aus (Tab. 1) (Aursnes et al., 2014; Recchiuti et al., 2014):

Tabelle 1: **Pharmakokinetik von Resolvin D1 (Recchiuti et al., 2014)**

Parameter	Werte
Bioverfügbarkeit (Area under the curve)	$AUC_{total} = 4.539 \frac{ng \cdot h}{ml}$
Clearence	$CL = Dosis / AUC_{total} = 22.03 \frac{ml}{h}$
Verteilungsvolumen	$V_d = CL / AUC_{total} = 4.85 ml$
Abbaurrate (First order elimination rate)	$K_{el} = \frac{0.231}{h}$
Halbwertszeit	$T_{1/2} = \frac{0.693}{K_{el}} \approx 3 h$

Grundsätzlich reguliert RvD1 Stoffwechselprozesse auf Ebene von Transkriptionsfaktoren, micro-RNAs und ausgewählten Genen. Die Wirkung von RvD1 wird über spezifische G-Protein-gekoppelte Rezeptoren vermittelt. Dazu zählen: 1. Lipoxin-A4-Rezeptor: auf vielen Zellen wie Leukozyten und strukturellen Zellen exprimiert. 2. GPR32: auf Phagozyten exprimiert (Friedman und Serhan, 2011). Dabei bindet das Resolvin an den Rezeptor, um daraufhin die Transkription von Genen spezifischer anti-inflammatorischer Mediatorstoffe zu starten (Chen et al., 2016; Eickmeier et al., 2017).

Aus Studien sind zahlreiche positive Eigenschaften für RvD1 beschrieben (Abb. 7): Erforscht ist dabei zum einen die direkte Wirkung auf Zielzellen, zum anderen die systemische Wirkung in spezifischen Krankheitsmodellen. So stoppt es, z.B. in Neutrophilen, die transendotheliale Migration, verhindert die Synthese von Prostaglandin E<sub>2</sub>, blockiert die IL-8- und PAF-induzierte Chemotaxis und hemmt die Bildung schädigender Superoxide und ROS (Rius et al., 2014; Seki et al., 2010; Serhan, 2010; Titos et al., 2011). In Makrophagen fördert RvD1 die Phagozytose von apoptotischen Zellen, pyogenen Stoffen und Bakterien (Seki et al., 2010; Serhan, 2010). Es ist sogar eine Umwandlung des pro-inflammatorischen M1-Makrophagen-Phänotyps zum anti-inflammatorischen M2-Makrophagen beschrieben (Rius et al., 2014; Titos et al., 2011).

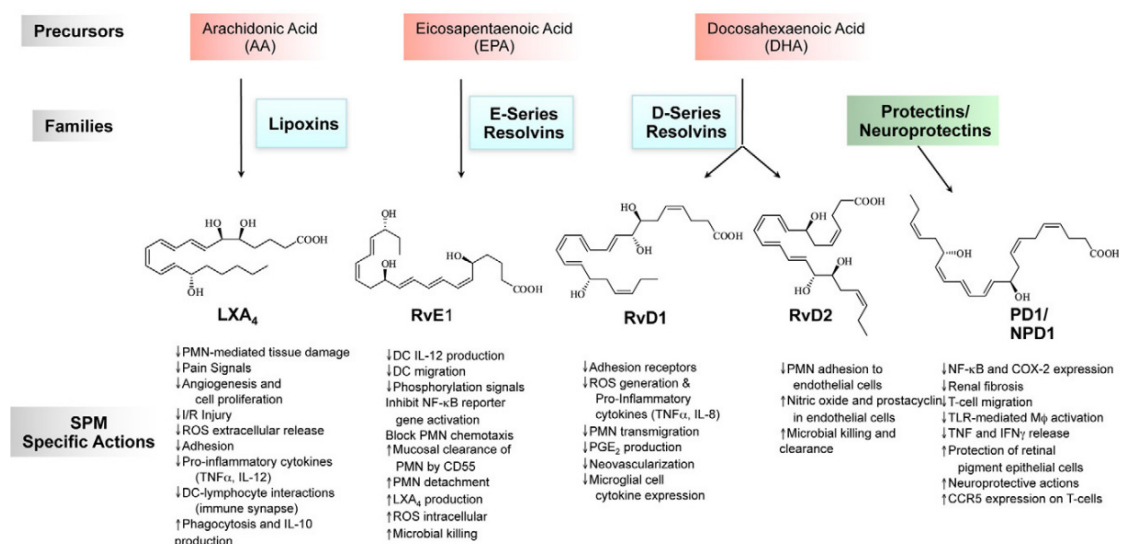


Abb. 7: Synthese und Eigenschaften anti-inflammatorischer Mediatoren (Serhan, 2010)

Protektive Effekte einer RvD1-Behandlung zeigten sich in der okulären Angiogenese durch Reduktion pathologischer Neovaskularisation, Granulozyten-Migration, Expression von Zytokinen und VEGFs (Friedman und Serhan, 2011). Bei der akuten ischämischen Nierenstörung konnte ebenfalls eine verminderte Granulozyten- und Monozyten-Infiltration, sowie ein erniedrigter postischämischer Anstieg im Serum-Kreatinin und eine geringere Ausbildung der Nierenfibrose durch die RvD1-Gabe beobachtet werden (Seki et al., 2010). Im Modell der mikrobiellen Sepsis resultierte eine RvD1-Behandlung in erhöhten Überlebensraten, einer gesteigerten Makrophagen-Phagozytose, einer geringeren lokalen und systemischen bakteriellen Belastung sowie einer verminderten Granulozyten-Infiltration und Synthese pro-inflammatorischer Zytokine (Seki et al., 2010). Auch eine Verringerung von spontanem und postoperativem Schmerz konnte bewiesen werden (Friedman und Serhan, 2011).

Noch besser erforscht sind die E-Resolvine, allen voran RvE1. Grundsätzlich konnten hier ähnliche Effekte der Pro-Resolution der Inflammation durch Hemmung der Leukozyten-Migration und Verminderung der Zytokinsynthese beobachtet werden (Arita et al., 2005). Ein beeindruckendes Ergebnis ist die Reduktion der Leberfibrose durch RvE1 in Mäusen mit einer *Schistosoma japonicum*-Infektion (Qiu et al., 2014). Zudem konnten bessere Therapieergebnisse bei Periodontitis, Asthma, Aspirationspneumonie, Peritonitis und chronisch entzündlichen Darmerkrankungen nachgewiesen werden (Seki et al., 2010). RvE1 ist zudem ein Ligand des Chemokine-like-Rezeptor 1, der bei der NAFLD deutlich erniedrigt ist (Wanninger et al., 2012). Resolvine stellen somit eine für die Therapie chronischer Lebererkrankungen erfolgsversprechende Substanzgruppe dar, deren Anwendung und potentiell therapeutische Wirksamkeit genauer untersucht werden sollte.

### 3.3 Zielsetzung

Die Leberfibrose stellt als eine Vorstufe der Leberzirrhose und des HCC eine der gravierendsten Erkrankungen der modernen Gesellschaft dar. Eine Therapie, die frühzeitig effizient die Entzündungsreaktion der Leber auf molekularer und zytologischer Ebene verhindert bzw. mildert, ist eine notwendige, innovative und vielversprechende Möglichkeit, um das Fortschreiten der Erkrankung aufzuhalten bzw. die Krankheit erfolgreich zu behandeln.

Für mehrfach-ungesättigte  $\omega$ -3-Fettsäuren konnten bereits zahlreiche positive metabolische und anti-inflammatorische Eigenschaften beobachtet werden. Die Wirkung der Fettsäuren könnte dabei durch deren Mediatoren, den Resolvinen, vermittelt sein.

Ziel dieser tierexperimentellen Studie war es daher zu überprüfen, inwieweit RvD1 das Potential besitzt, in den Prozess der Fibrosierung einzugreifen, und speziell die Inflammation aufzuhalten bzw. aufzulösen. Dabei wurde das in der Arbeitsgruppe Abshagen et al. (2015) gut etablierte Modell der Gallengangsligatur genutzt, wodurch eine cholestatische Leberfibrose induziert wird.

In einem prophylaktischen Therapieansatz wurden folgende Fragestellungen untersucht:

- Resultiert eine tägliche RvD1-Behandlung in einer reduzierten inflammatorischen Antwort?
- Reduziert eine tägliche RvD1-Gabe das Ausmaß des Leberschadens und der Leberfibrose?
- Gibt es ein besseres Outcome der RvD1-behandelten Tiere?

## 4 Material und Methoden

### 4.1 Versuchstiere

Für die Versuche wurden 12 bis 16 Wochen alte, männliche Balb/c-Mäuse (Charles-River-Laboratories in Sulzfeld, Deutschland) mit einem Gewicht von 20-35 g verwendet. Dieser Mausstamm hat sich vielfach als sehr sensitiv für chronische Lebererkrankungen und inflammatorische Prozesse herausgestellt und wurde in unserer Arbeitsgruppe als Modellorganismus bereits mehrfach verwendet. Die Tiere wurden bei 22-24°C Raumtemperatur in klimatisierten Räumen und einer Luftfeuchtigkeit von 60-70 % bei einem 12-h-Tag-Nacht-Rhythmus in der Zentralen Versuchstierhaltung im Institut für Experimentelle Chirurgie (ZVTH) der Universitätsmedizin Rostock gehalten. Für die Studienzeit erhielten die Mäuse Standardlaborfutter (Ssniff Spezialdiäten GmbH, Soest, Deutschland) und Wasser ad libitum.

Sowohl die nationalen Tierschutzgesetze sowie internationalen Richtlinien (Guide for the Care and Use of Laboratory Animals; National Institutes of Health publication 86-23, Revised 1985), als auch die Nutzerordnung der ZVTH der Universitätsmedizin Rostock unter Kontrolle des Tierschutzbeauftragten PD Dr. rer. nat. Dietmar Zechner wurden für die gesamte Studienzeit eingehalten.

### 4.2 Praktische Anwendung

#### 4.2.1 Anästhesie

Für die Gallengangsligatur wurden die Versuchstiere mittels Inhalationsnarkose anästhesiert. Dabei erfolgte zunächst eine Einleitungsnarkose in einer Plexiglaskammer mit 5 Vol. % Isofluran, 1,2 l O<sub>2</sub> pro min und 2,4 l N<sub>2</sub>O pro min. Zeigten die Tiere keine Stellreflexe mehr, wurden sie auf eine Wärmeplatte überführt, die Atemmaske wurde angelegt, eine schützende Augensalbe aufgetragen und das Operationsgebiet gründlich rasiert. Dabei wurde das Gasgemisch auf ein Verhältnis von 1-1,5 Vol. % Isofluran, 1 l O<sub>2</sub> pro min und 0,8 l N<sub>2</sub>O pro min. umgestellt. Die Narkosetiefe wurde vor Beginn der Operation durch einen Reflextest zwischen den Zehen überprüft. Je nach Alter, Größe, Gewicht und individuellem

Zustand der Maus musste die Narkose minimal verändert werden. Postoperativ erfolgte nach dem sauberen Zunähen der Haut eine Beatmung von ca. 30 Sekunden mit Sauerstoff sowie eine anschließende Erholungsphase von mindestens 20 min unter einer Wärmelampe. Bereits einen Tag präoperativ, sowie für den gesamten weiteren Versuchszeitraum erhielten die Tiere Metamizol (100 mg (= 4 ggt) pro 100 ml H<sub>2</sub>O) täglich frisch ins Trinkwasser, um eine weitgehende Analgesie zu ermöglichen.

#### 4.2.2 Gallengangsligatur (BDL)

Nach erfolgreicher Anästhesie wurde das Versuchstier auf eine Heizplatte mit 36°-37°C gelegt, um Wärme- und Energieverluste zu verhindern. Nach einer Rasur des Bauches wurde das Operationsgebiet großzügig desinfiziert (Betasisodona®) und mit sauberen OP-Tüchern ausgelegt. Operiert wurde mit Mundschutz unter einem Stereomikroskop bei 6-10-facher Vergrößerung (Abb. 8a). Sämtliches OP-Besteck wurde vor Gebrauch mit Ethanol (96 %) desinfiziert.

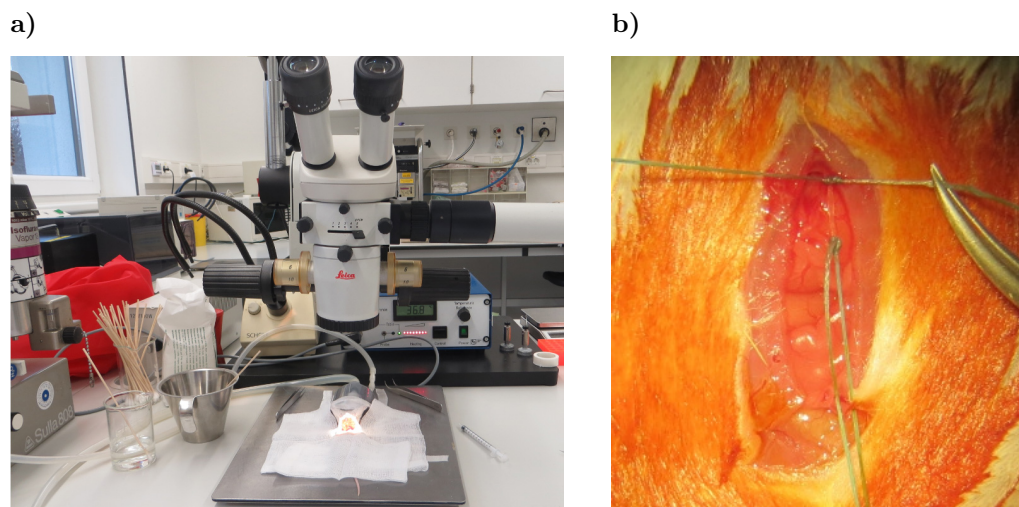


Abb. 8: a) OP-Arbeitsplatz, b) Ligatur des Ductus choledochus

Nach überprüfter Schmerz- und Reflexfreiheit wurde ein kleiner vertikaler Schnitt von 1-1,5 cm in der Median- bzw. Medioclavikularlinie rechts der Hautschichten und des darunterliegenden Peritoneums gesetzt. Mit sauberen, feuchten (0,9 % NaCl-Lösung) Wattetupfern wurde der Ductus choledochus am unteren Leberrand aufgesucht und präpariert. An-

schließlich wurden drei Ligaturfäden geknotet (zwei oberhalb, eine unterhalb der Durchtrennung) (Abb. 8b), um eine Peritonitis durch Galleaustritt zu verhindern. Dann wurde der Ductus choledochus zwischen der mittleren und distalen Ligatur durchtrennt (Abschagen et al., 2015; Tag et al., 2015). Bevor das Peritoneum und die Hautschicht wieder vernäht wurden (Prolene 5,0), bekamen die Versuchstiere ausreichend 0,9 % NaCl-Lösung i.p., um ein Austrocknen und einen intraoperativen Flüssigkeitsverlust zu kompensieren. Zum Schutz der Wunde wurde ein Sprühverband (OPSITE von smith&nephew) aufgetragen. Nach der Operation wurde die Maus auf ein sauberes Zellstoffpapier zurück in den Käfig gelegt und für ca. 20 min bis zum Erwachen mit Rotlicht bestrahlt. Das Futter wurde am Boden in Reichweite gelegt. Der Zustand des Tieres, das Gewicht und die Nähte wurden täglich überprüft.

#### 4.2.3 Versuchsaufbau

Für den Versuch wurden die Tiere randomisiert zwei Gruppen zugeordnet: die erste Gruppe erhielt nach der BDL täglich eine intraperitoneale Injektion von RvD1 (2 ng/g KG i.p. gelöst in 0,1 % Ethanol). Die zweite Gruppe von Tieren erhielt täglich adäquate Volumina von 0,1 % Ethanol i.p. und diente als Kontrollgruppe (Abb. 9).

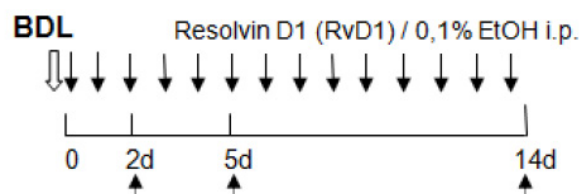


Abb. 9: Versuchsaufbau

Bei der i.p.-Injektion war stets darauf zu achten, sauber zu arbeiten, um das Infektionsrisiko gering zu halten. Zudem wurde die Injektion immer zum gleichen Tageszeitpunkt durchgeführt. Es wurden drei Untersuchungszeitpunkte gewählt: 2, 5 und 14 Tage nach BDL (Abb. 9), welche sowohl die frühe als auch die späte Phase der Fibrosierung repräsentieren. Pro Behandlungsgruppe und Zeitpunkt wurden jeweils 10 Tiere untersucht.

#### 4.2.4 Blut- und Gewebeentnahme

Zu den oben angegebenen postoperativen Tagen wurden Blut und Leber asserviert. Dabei erfolgte die Entnahme zum gleichen Tageszeitpunkt wie die i.p.-Injektion. Vor der Entnahme wurde die Maus mit einem Gemisch aus Ketamin (65 mg/kg KG von Bela-pharm) und Xylazin (25 mg/kg KG Rompun von Roche) in einer Dosierung von 0,013 ml pro 10 g KG anästhesiert und mit 0,05 ml einer 1:10 verdünnten Lösung (nur Ketamin) nachdosiert. Die Narkosetiefe wurde vor der Gewebeentnahme jeweils durch Reflexprüfung an den Zehen überprüft. 1 h vor der Asservierung wurde bei allen Versuchstieren BrdU (100 µl pro 10 g KG) gespritzt, um eine einheitliche Einwirkzeit des Proliferationsmarkers zu gewährleisten. Zudem erfolgte die gründliche Rasur und Desinfektion des Abdomens.

Zuerst erfolgte die Blutentnahme, in erster Linie retrobulbär, u.U. auch direkt aus der V. cava oder der rechten Herzkammer. Bei der retrobulbären Blutentnahme wurde das Tier durch Druck auf das Nackenfell zwangsfixiert, wodurch es zu einer Stauung der V. jugularis und damit der Gefäße des retrobulbären Venenplexus kam. Mit einer Kapillare wurde unter Druck mit leichten Drehbewegungen im inneren Augenwinkel in Richtung des gegenüberliegenden Kiefergelenks der Venenplexus punktiert und das Blut in Calcium-beschichteten EDTA-Röhrchen gesammelt. Es wurden mindestens 500 µl Blut entnommen. Die Leberentnahme erfolgte möglichst zeitnah und sauber unter zügigem Arbeiten. Hierfür wurde die Maus großzügig laparotomiert und die Leber von ihren Bändern und Gefäßen getrennt und die Gallenblase entfernt. Anschließend wurde das Tier durch eine Überdosis Ketamin und mittels Genickbruch euthanasiert.

Danach wurde das Feuchtgewicht der Leber notiert und die Leber für nachfolgende Analysen wie folgt aufbereitet (Abb. 10): für histologische und immunhistochemische Färbungen wurde der linke Leberlappen bei Raumtemperatur in 4 % Formalin fixiert. Der mittlere Lappen wurde mit Gewebekleber (Tissue-Tek®) auf einem Gewebeblock in flüssigem Stickstoff schockgefrostet und bei -20°C gelagert. Die Lobi caudatus et dexter wurden für molekularbiologische Untersuchungen zerkleinert, in Flüssigstickstoff gefrostet und bei -80°C gelagert.



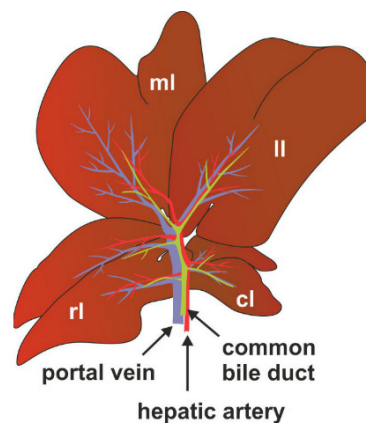


Abb. 10: Anatomie der Leberlappen der Maus (ll = linker, rl = rechter, ml = mittlerer Lappen, cl = Lobus caudatus) (Tag et al., 2015)

## 4.3 Untersuchungstechniken

### 4.3.1 Vollblutanalyse

Das Blut wurde unmittelbar nach der Entnahme durch den Hämatologie-Analysator (Sysmex KX-21 N, Sysmex, Norderstedt) ausgewertet. Dabei wurde die Zahl der Erythrozyten, Leukozyten, Thrombozyten, der Hämatokrit und Hämoglobin-Gehalt sowie die Verteilung der Leukozyten bestimmt.

Das restliche Probenmaterial wurde bei 4000 rpm für 10 min zentrifugiert (GS15 Zentrifuge, Beckman Coulter GmbH, Krefeld, Deutschland), das Blutplasma abpipettiert und für nachfolgende Analysen bei -20°C gelagert.

### 4.3.2 Plasmaanalyse

Die Aktivitäten der Blutenzyme ALT (Alanin-Aminotransferase), AST (Aspartat-Aminotransferase), AP (Alkalische Phosphatase) und GLDH (Glutamat-Dehydrogenase), sowie Bilirubin (total und direkt) wurden mittels automatisierter photospektrometrischer Analyse gemäß der Herstellerangaben (Cobas c111, Roche Diagnostics, Schweiz) bestimmt.

### 4.3.3 Histologie

Nachdem das Gewebe für mindestens 24 h in 4 % Formalin fixiert wurde, folgte die Entwässerung in aufsteigender Alkoholreihe und die Einbettung in Paraffinwachs (Merck, Darmstadt, Deutschland). Mit Hilfe eines Mikrotoms (Leica RM 2145, Wetzlar, Deutschland) wurde das Gewebe auf 4 µm Dicke geschnitten und auf Objektträgern fixiert. Nach einer Inkubationszeit von 30 min bei 65°C und einer Entparaffinisierung durch Alkohollösungen wurde das Gewebe mit PBS-Lösung gewaschen.

#### Hämatoxylin-Eosin (H.E.)

Für die Übersichtsfärbung erfolgte zunächst eine Anfärbung des Leberschnittes mit Hämaun für 5 min, eine Spülung mit lauwarmem fließenden Leitungswasser für 10 min und schließlich die einmütige Färbung mit 0,5 % Eosin. In einer aufsteigenden Alkoholreihe mit 70 %, 96 % und 100 % für jeweils 1 min wurde das Präparat fixiert und mit einem X-TRA-Kitt eingedeckt. Als Ergebnis erhielt man eine Färbung der Zellkerne in blau und des Zytoplasmas in rötlich-violett.

Die H.E.-Färbung diente zur Analyse der Nekrosefläche (Galleninfarkte), die sich als deutlich farblose Areale abzeichnen. Die Auswertung erfolgte dabei unter dem Lichtmikroskop (100x Vergrößerung, Olympus BX 51, Hamburg, Deutschland) mittels der Color View II FW Kamera (Color View, München, Deutschland) mit Auswahl von 30 repräsentativen Gesichtsfeldern. Die nekrotischen Areale wurden mit Hilfe von Adobe Photoshop CS6 histomorphometrisch berechnet.

#### Sirius-red

Zur Darstellung des kollagenen Bindegewebes wurden die Leberschnitte mit Pikro-Sirius-rot-Lösung ("direct Red 80", 0,1 g in 100 ml gesättigter wässriger Pikrinsäurelösung) für 1 h bei Raumtemperatur gefärbt. Danach wurden die Schnitte mit verdünnter Essigsäure (10 ml Eisessig mit 22 ml Aqua dest.), Leitungswasser und Aqua dest. gewaschen, um anschließend für 5 min mit Hämaun und 10 min unter Leitungswasser inkubiert zu werden. Auch hier erfolgte die Fixierung in einer aufsteigenden Alkoholreihe (70 %, 96 % und

100 %) für jeweils 1 min und die Eindeckung mit einem X-TRA-Kitt.

Die gefärbten Schnitte wurden als gesamtes Präparat, maximal jedoch 30 Gesichtsfelder, ebenfalls mit dem Lichtmikroskop (100x Vergrößerung, Olympus BX 51, Hamburg, Deutschland) und mittels Color View II FW Kamera (Color View, München, Deutschland) abfotografiert, um anschließend mit Hilfe von Adobe Photoshop CS6 die Pixel des Kollagen positiven Farbbereiches zusammenzufassen und per Histogramm auszuzählen.

#### **Naphtol-AS-D-Chlorazetatesterase (CAE)**

Naphtol-AS-D-Chlorazetatesterase (CAE) dient zur Anfärbung der Granulozyten im Gewebe als Parameter der inflammatorischen Antwort. Zuerst wurden dafür 10 mg Echtgranatsalz in 100 ml PBS und 16 mg Naphthol-AS-D-Chlorazetat in 2 ml DMSO gelöst. Beide Lösungen wurden gemischt, geschüttelt, filtriert und die Schnitte für 1 h bei Raumtemperatur mit der Lösung inkubiert. Nach dem Wässern erfolgte das Waschen mit Aqua dest., die Färbung mit Hämalan für 5 min, das Bläuen für 10 min und das Eindecken mit einem Ultramount-Medium. Als Ergebnis erhielten alle Granulozyten rot-rosa Zellkerne, die direkt unter dem Lichtmikroskop (400x Vergrößerung, Olympus BX 51, Hamburg, Deutschland) in 30 Gesichtsfeldern pro Schnitt ausgezählt wurden.

#### **4.3.4 Immunhistochemie**

Bei der Immunhistochemie macht man sich die Antigen-Antikörper-Reaktion mit einem gekoppelten chemisch-enzymatischen Detektionssystem zunutze, um spezifische Strukturen nachzuweisen (Noll et al., 2000). Paraffinschnitte wurden mit Hilfe des Mikrotoms (Leica RM 2145, Wetzlar, Deutschland) auf 4 µm Dicke angefertigt und auf Poly-L-Lysin beschichtete Objektträger aufgetragen. Die zuvor durchgeführte Formalinfixierung führt meist zu Proteinvernetzungen im Gewebe, die eine Antikörperbindung verhindern können. Deshalb wurde das Gewebe entparaffinisiert, sodass mittels Hitzedenaturierung die Antikörperbindungsstellen frei werden. Nach einer zweistündigen Inkubationszeit im Brutschrank wurden die unspezifischen Bindungsstellen mit einer Blockierungslösung in Wasser äquilibriert. Dann erfolgte die Inkubation mit dem Primärantikörper, der spezi-

fisch an die gesuchte Struktur bindet. Dabei kann die Inkubationszeit und -temperatur der einzelnen Antikörper variieren, erfolgte jedoch meistens über Nacht bei 4°C. Nach einer Waschung mit PBS wurde der Sekundärantikörper hinzugefügt, der spezifisch an den Primärantikörper bindet und mit einem Enzym gekoppelt ist. Die Zugabe von geeignetem Enzymsubstrat sorgt für die erfolgreiche Katalysierung der enzymatischen Nachweisreaktion. Nach weiteren Waschungsphasen, um überschüssiges Material zu entfernen, erfolgte die Gegenfärbung mit Hämalaun, die Entwässerung und Eindeckung zur Fixierung des Materials.

### **Bromdesoxyuridin (BrdU)**

Die immunhistochemische Detektion von BrdU dient dem Nachweis proliferierender Zellen als Maßgabe für den Zellumsatz im Gewebe. Dabei wurde den Versuchstieren eine Stunde vor Gewebeentnahme eine gewichtsadaptierte Menge BrdU gespritzt (100 µl pro 10 g KG). Das BrdU baut sich als Thymidinanalogon in die DNA proliferierender Zellen ein.

Als Primärantikörper diente ein mouse-anti-BrdU (1:50, DAKO MO774) und als Sekundär-Antikörper ein goat-anti-mouse HRP (1:100, DAKO PO447). Als Substrat dieser Reaktion wurde 3,3-Diaminobenzidin (DAB) (K3467, Dako Deutschland GmbH, Hamburg Deutschland) genutzt.

Die Auswertung erfolgte unter dem Lichtmikroskop (400x Vergrößerung, Olympus BX 51, Hamburg, Deutschland) durch Auszählung von 30 Gesichtsfeldern, wobei zudem zwischen Hepatozyten mit großen, kreisrunden, braun-gefärbten Zellkernen und Nicht-Parenchymzellen, die sich mit deutlich kleineren, braun-gefärbten Zellkernen und variableren Zellformen abbildeten, unterschieden wurde.

### **Kollagen-1 $\alpha$**

Kollagen-1 $\alpha$  liefert als Produkt der HSC eine hinreichend exakte Wiedergabe des fibrogenen Umbaus. Als Primärantikörper wurde 1 $\alpha$ -rabbit-anti-mouse-Collagen (1:200, Abcam 34710) und als Sekundärantikörper ein goat-anti-rabbit HRP (1:100, DAKO PO448) verwendet. DAB (K3467, DAKO Deutschland GmbH, Hamburg Deutschland) wurde als

Chromogen genutzt. Ausgewertet wurde durch Aufnahme von 30 Gesichtsfeldern unter dem Lichtmikroskop (100x Vergrößerung, Olympus BX 51, Hamburg, Deutschland) mittels Color View II FW Kamera (Color View, München, Deutschland) und anschließender Adobe Photoshop CS6-gestützter Auszählung per Histogramm mittels Ermittlung aller Pixel gleichen Farbbereiche.

### **$\alpha$ -Smooth Muscle Actin ( $\alpha$ -SMA)**

$\alpha$ -SMA dient als direkter Nachweis aktivierter HSC und ist damit ein wichtiger Parameter für die Pathogenese der Leberfibrose. Angewandt wurde der Primärantikörper rabbit-anti-mouse  $\alpha$ -SMA (1:600, Abcam 5694) und der Sekundärantikörper goat-anti-rabbit AP (1:100, DAKO DO487). Zur Visualisierung des Sekundärantikörpers wurde mit Liquid Permanent Red Chromogen (KO640, Dako Deutschland GmbH, Hamburg, Deutschland) gefärbt.

### **F4/80**

F4/80 dient zur Detektion von Makrophagen (Hamann et al., 2007), die im Rahmen der Leberfibrose in der Vermittlung zwischen Inflammation und Fibrogenese bedeutsam sind. Es wurde der Primärantikörper Seroke MAC 497 rat-anti-mouse (1:10) und als Sekundärantikörper ein goat-anti-rat AP (1:200, Santa Cruz SC2021) verwendet. Als chromogenes Substrat wurde Liquid Permanent Red Chromogen (KO640, Dako Deutschland GmbH, Hamburg, Deutschland) genutzt.

Zur Auswertung wurden 30 Gesichtsfelder unter dem Lichtmikroskop (400x Vergrößerung, Olympus BX 51, Hamburg, Deutschland) mittels Color View II FW Kamera (Color View, München, Deutschland) abfotografiert und anschließend die F4/80-positiven Zellen mit der Software ImageJ 1.50i (Wayne Rasband, National Institutes of Health, USA) ausgezählt. Als positiv galt eine Zelle, wenn der Zellkern dunkelblau und die Umgebung der Zelle rot gefärbt war.

#### 4.3.5 Western-Blot

Für die Proteinanalyse werden Proteine aus den Geweben extrahiert und der anschließende Proteingehalt bestimmt, um eine definierte Menge in einer SDS-PAGE aufzutrennen. Anschließend werden sie im Rahmen eines Western-Blots mittels Antikörper und enzymatisch-chemischer Reaktion auf einer transferierten Membran nachgewiesen und quantifiziert. 30 mg Lebergewebe wurden jeweils mit Hilfe von flüssigem Stickstoff abgewogen und in vorbereitete Röhrchen mit Mahlkugeln gegeben. Mit Hilfe eines Dismembrators wurden die Proben pulverisiert und in 300 µl Lysispuffer (100 µl pro 10 mg Gewebe) aufgenommen. Nach einer Inkubationszeit von 30 min auf Eis, begleitet von mehrfachem Schütteln, wurde nach einer gekühlten (4°C) Zentrifugation von 10 min bei 10000 rpm der Überstand mit den extrahierten Proteinen abpipettiert. Für den weiteren Verlauf ist es entscheidend, die Gesamtproteinmenge pro Probe zu bestimmen, um jeweils die gleiche Menge auf das Gel aufzutragen. Dafür wurde die BCA-Methode (Bicinchoninic Acid) genutzt: das BCA-Gemisch wurde in einem für Lebergewebe definierten Verhältnis von 1:30 des BCA-Protein Assay Reagent B mit Reagent A gemischt. Anschließend wurde eine BSA-Standardkurve erstellt (0,1-1 mg pro ml). Die Proteinbestimmung erfolgte im 3-fach-Ansatz in einer 96-Mikrotiterplatte mit jeweils 25 µl der verdünnten, gut durchmischten Probe. Für den Nachweis wurden 200 µl des fertigen BCA-Gemisches hinzugegeben und die Proben für 30 min bei 37°C auf einen Schüttler gestellt, um die Absorption anschließend bei 562 nm im TECAN ELISA-Reader (TECAN Sunrise Magellan 3) zu messen. Nun wurden die Proteine in einer SDS-PAGE aufgetrennt: dafür wurden Probenkonzentrationen von 20, 40 oder 60 µl eingestellt. Das berechnete Volumen wurde mit Zweifach-Probenpuffer versetzt und mit Einfach-Probenpuffer auf 25 µl aufgefüllt. Für die Denaturierung wurden die Proben bei 95°C für 5 min in einem Heizblock inkubiert. Das gesamte Probenvolumen wurde dann auf das SDS-Gel geladen. Zeitgleich zur Probenherstellung ist das Trenngel zu gießen (Tab. 2). Zudem ist darauf zu achten, dass die Konzentration an Acrylamid abhängig von dem Molekulargewicht der Proteine in kDa ist: bei Proteinen mit einem Molekulargewicht zwischen 17 bis 30 kDa 14 %, 30 bis 50 kDa 12 %, größer 50 kDa 8-10 %, größer 100 kDa 6 %.

Tabelle 2: **Zusammensetzung Trenngel**

<b>Substanz</b>	<b>Konz.</b>	<b>6 %</b>	<b>8 %</b>	<b>10 %</b>	<b>12 %</b>	<b>14 %</b>	<b>15 %</b>
H <sub>2</sub> O		4,05	3,35	2,75	2,05	1,34	1,05
Tris pH 8,8 [ml]	1 M	3,75	3,75	3,75	3,75	3,75	3,75
Acrylamid [ml]	30 %	2	2,7	3,3	4	4,7	5
SDS [ $\mu$ l]	10 %	100	100	100	100	100	100
APS [ $\mu$ l]	10 %	100	100	100	100	100	100
TEMED [ $\mu$ l]		10	10	10	10	10	10

Nachdem das Trenngel zwischen zwei Glasplatten gegossen und mit Isopropanol überschichtet wurde, wurde nach erfolgter Polymerisation das Isopropanol abgekippt, das Sammelgel wie folgt hergestellt (Tab. 3) und auf das Trenngel geschichtet:

Tabelle 3: **Zusammensetzung Sammelgel**

<b>Substanz</b>	<b>Konz.</b>	<b>Menge</b>
H <sub>2</sub> O		4,1
Tris pH 6,8 [ml]	1 M	0,75
Acrylamid [ml]	30 %	1
SDS [ $\mu$ l]	10 %	50
APS [ $\mu$ l]	10 %	50
TEMED [ $\mu$ l]		5

Der Probenkamm wurde in das Gel eingesetzt, welches anschließend für 30 min polymerisierte. Danach wurde der Kamm entfernt und die Glasplatten mit den Gelen in die Elektrophorese-Einheit eingebaut. Diese wurde mit dem Laufpuffer gefüllt, bis die Taschen circa 4 mm überschichtet waren. Nun wurden die Proben vorsichtig in die Taschen pipettiert und bei 20 mA (für 2 Gele) elektrophoretisch aufgetrennt, bis sie das Sammelgel passiert hatten. Anschließend wurde die Auftrennung bei 40-45 mA fortgesetzt, bis die Farbstofffront fast vollständig aus dem Gel getreten ist. Nun schloss sich der eigentliche

Western-Blot an: die Proteine im SDS-Gel wurden mittels Semi-Dry-Blot-Verfahren auf eine Membran transferiert. Dazu wurde zuerst das Blotting-Papier auf Gelgröße zugeschnitten und in den entsprechenden Puffern äquilibriert. Die Puffer wurden wie folgt hergestellt (Tab. 4-6):

Tabelle 4: **Anodenpuffer I (pH 10,4)**

<b>Substanz</b>	<b>Konz.</b>	<b>Menge</b>
Tris [g]	300 mM	9,0855
Methanol [ml]	20 %	50
auf 250 ml H <sub>2</sub> O auffüllen		

Tabelle 5: **Anodenpuffer II (pH 10,4)**

<b>Substanz</b>	<b>Konz.</b>	<b>Menge</b>
Tris [g]	25 mM	0,757
Methanol [ml]	20 %	50
auf 250 ml H <sub>2</sub> O auffüllen		

Tabelle 6: **Kathodenpuffer (pH 9,4)**

<b>Substanz</b>	<b>Konz.</b>	<b>Menge</b>
Tris [g]	25 mM	0,757
Glycin [g]	40 mM	0,751
Methanol [ml]	20 %	50
auf 250 ml H <sub>2</sub> O auffüllen		

Auch die PVDF-Membran wurde auf die Gelgröße zugeschnitten, beschriftet und für 15 s in 100 % Methanol gewässert und anschließend für 2 min in H<sub>2</sub>O überführt. Danach äquilibrierte diese für mindestens 5 min im Anodenpuffer II. Der Blot wurde wie folgt aufgebaut und für 1 h 45 min bei 2,8 mA pro cm<sup>2</sup> geblottet (Abb. 11): Nun wurde der Blot auseinandergebaut, die Membran kurz in TBST gewaschen und in Blockierlösung



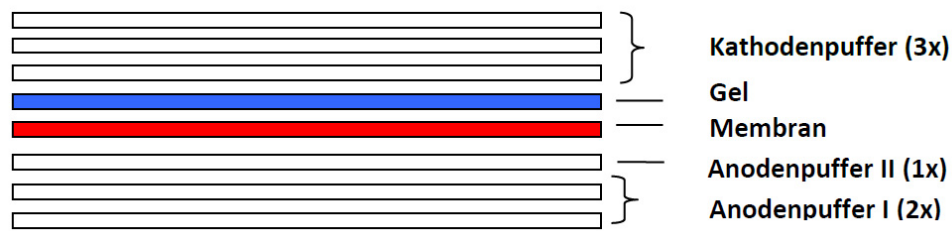


Abb. 11: Aufbau des Semi-Dry-Blots

(BSA) über Nacht im Kühlschrank bei 4°C oder 30 min bei 37°C im Inkubator blockiert. Anschließend begann die Inkubation mit dem Primärantikörper Anti-mouse-IgG (Sigma) in Verdünnung ( $\alpha$ -SMA 1:1000, GAPDH 1:20000) für 2 h bei Raumtemperatur. Danach wurde die Membran 3 x 10 min mit PBS gewaschen und der peroxidasegebundene (HRP linked) Sekundärantikörper in der entsprechenden Verdünnung ( $\alpha$ -SMA 1:20000, GAPDH 1:40000) für 1 h bei Raumtemperatur auf dem Schüttler inkubiert. Nach einem weiteren Waschgang erfolgte schließlich die Detektion mit ECL-Plus. Dazu wurde eine 1:50-Verdünnung des ECL-Plus-Reagenz angesetzt, die Lösung auf die Membran gegeben und für 5 min inkubiert. Die Proteinexpression von  $\alpha$ -SMA konnte nun mittels Universalhood (BioRad) visualisiert, mit dem ChemiDoc XRS System (BioRad) digitalisiert und densitometrisch als relative Dichte im Vergleich zu GAPDH ausgewertet werden.

#### 4.3.6 RT-PCR

Für die Quantifizierung der mRNA-Genexpression wurde die RT-PCR durchgeführt. In der Studie wurde die mRNA-Expression von Kollagen-1 $\alpha$ , CD206, F4/80 und TNF- $\alpha$  untersucht und im Verhältnis zu dem Housekeeping-Gen Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) bestimmt.

Wie für den Western-Blot wurden 30 mg Gewebe unter flüssigem Stickstoff abgewogen und mit Hilfe eines Dismembrators pulverisiert. Anschließend wurde die RNA mit Hilfe des RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland) entsprechend den Angaben des Herstellers isoliert und die Konzentration spektrophotometrisch (Nanodrop 2000 Spectrophotometer, PegLab Biotechnologie GmbH, Deutschland) bestimmt. Die Berechnung erfolgte nach folgender Formel:

$$\text{RNA-Konzentration } [\mu\text{g}/\mu\text{l}] = \frac{\text{Extinktion } 260 \text{ nm} \cdot \text{Verdünnung} \cdot 40}{1000}$$

Als nächstes war die Synthese der cDNA von entscheidender Bedeutung, wofür folgender Denaturierungsansatz angesetzt wurde (Tab. 7):

Tabelle 7: **Denaturierungsansatz**

<b>Substanz</b>	<b>Menge</b>
RNA	2 $\mu\text{g}$
RNase freies Wasser	ad 11 $\mu\text{l}$
Oligod(T) 18 mRNA Primer	1 $\mu\text{l}$
Gesamtvolumen = 12 $\mu\text{l}$	

Tabelle 8: **cDNA-Synthese-Mastermix**

<b>Substanz</b>	<b>Menge</b>
5x First Strand Buffer	4 $\mu\text{l}$
0,1 M DTT	2 $\mu\text{l}$
10 mM dNTPs	1 $\mu\text{l}$
Superscript	1 $\mu\text{l}$
Volumen MM-Mix	8 $\mu\text{l}$
+ Volumen RNA Oligo Mix	12 $\mu\text{l}$
Gesamtvolumen für eine Probe = 20 $\mu\text{l}$	

Nun erfolgte zuerst die Denaturierung im Mastercycler (Mastercycler gradient, Eppendorf, Wesseling Berzdorf, Deutschland) mit dem Programm „RNADENAT“ (10 min 72°C, 4°C hold). Danach wurden auf Eis je 8  $\mu\text{l}$  cDNA-Synthese-Mastermix (Tab. 8) hinzugegeben und das Programm „RT 42“ (1h 42°C, 5 min 95°C, 4°C hold) im Mastercycler ausgeführt. Die Reverse Transkriptase sorgte dafür, dass der mRNA-Strang in cDNA umgeschrieben wird. Die erhaltende cDNA wurde nun mit dem Primermix beladen. Die Effizienz aller verwendeten Primer (Tab. 9) wurde zuvor bestimmt.

Tabelle 9: **Primersequenzen der RT-PCR**

<b>Gen</b>	<b>Primer</b>	<b>Sequenz 5' <math>\rightarrow</math> 3'</b>
Kollagen-1 $\alpha$	vorwärts	GAAACCCGAGGTATGCTTGA
	rückwärts	GACCAGGAGGACCAGGAAGT
CD206	vorwärts	CTTCATCTTCGGGCCTTTGG
	rückwärts	CCGGCACCTATCACAATCAG
F4/80	vorwärts	CTTTGGCTATGGGCTTCCAGTC
	rückwärts	GCAAGGAGGACAGAGTTTATCGTG
TNF- $\alpha$	vorwärts	AGGCTCTGGAGAACAGCACAT
	rückwärts	TGGCTTCTCTTCCTGCACCAAA
GAPDH-177	vorwärts	GAATTTGCCGTGAGTGGAGT
	rückwärts	CGTCCCGTAGACAAAATGGT

Nun erfolgte die durch die Taq-Polymerase katalysierte Vervielfältigung der DNA mit Hilfe des Light Cycler (Roche) oder dem StepOnePlus Real Time PCR System (ABI) unter Berücksichtigung der Herstellerangaben. Schließlich erfolgte eine Software-gestützte Auswertung nach der  $\Delta\Delta\text{CT}$ -Methode.

#### 4.3.7 Multiplex-Zytokin-Analyse

Um eine umfassende Analyse systemischer Inflammationsparameter zu erhalten, wurde eine Multiplex-Zytokin-Analyse durchgeführt. Die Analyse erfolgte aus dem Blutplasma durch die Firma Biorad in Hamburg (Dr. M. Möller).

Dafür wurden zum einen die pro-inflammatorischen Zytokine IL-18, MCP-1, IL-6 und TNF- $\alpha$  untersucht, zum anderen die anti-inflammatorischen Faktoren IL-10 und TGF- $\beta$ . IL-1 $\beta$  und TNF- $\alpha$ , die anti-fibrotischen, und IL-6, PDGF-bb und TGF- $\beta$ , die pro-fibrotischen Zytokine, wurden ebenfalls analysiert (Liu et al., 2012; Schuppan et al., 2001).

#### 4.3.8 Statistik

Alle Ergebnisse wurden in Excel-Tabellen übertragen, um Mittelwert (MW), Standardabweichung (SD) und Standardfehler des Mittelwertes (SEM) jeder untersuchten Gruppe zu berechnen. Zudem wurde für jede Gruppe und jeden Parameter ein Grubbs-Ausreißer-Test durchgeführt, bei dem die Differenz von Mittelwert und Probenergebnis gebildet und daraus der Quotient mit der Standardabweichung errechnet wurde. Übertraf ein Ergebnis den kritischen Wert von 5 %, so wurde dieser in der weiteren statistischen Auswertung nicht berücksichtigt.

Die grafische Darstellung erfolgte mit Hilfe der Software SigmaPlot 12.0 (Jandel Corp., San Rafael, CA, USA), wobei die Mittelwerte zusammen mit dem Standardfehler des Mittelwertes (SEM) dargestellt wurden. Die statistische Auswertung wurde ebenfalls mit SigmaPlot durchgeführt, wobei der Gruppenvergleich mit dem One-Way-ANOVA (Dunn's Methode) durchgeführt wurde. Bei nichtnormalverteilten Proben kam der einfaktorielle ANOVA-on-Ranks (Dunn's-Methode) zur Anwendung. Betrug die Irrtumswahrscheinlichkeit weniger als 5 %, galt der Unterschied als statistisch signifikant.

## 5 Ergebnisse

### 5.1 Allgemeinzustand

Die Versuchstiere wurden täglich vor der i.p.-Injektion von RvD1 begutachtet. Neben der Beurteilung von Aktivität oder Apathie wurde auch das Körpergewicht kontrolliert. Bei allen Versuchstieren kam es postoperativ zur Gewichtsabnahme, wobei es zwischen den Gruppen keine Unterschiede gab. Im Durchschnitt konnten am 2. Tag postoperativ 88 %, am 5. Tag 87 % und am 14. Tag 82 % des Ausgangsgewichts beobachtet werden.

Über den gesamten Studienzeitraum sind insgesamt 14 Tiere postoperativ verstorben, davon 8 Kontrolltiere und 6 RvD1-behandelte (jeweils im Schnitt am 7. postoperativen Tag). Durch sauberes Arbeiten, standardisiertes, schnelles und präzises Operieren sowie durch optimale Narkoseführung ist intraoperativ keine Maus verstorben.

Grundsätzlich ist festzustellen, dass Veränderungen der Tiere in Bezug auf Aktivität, Apathie, Schmerzempfindung, Ansprechen auf Metamizol, Inflammation u.a. sehr individuell ohne definierte Gruppen-Zugehörigkeit auftraten. Der progrediente Erkrankungsverlauf sorgte mit zunehmender postoperativer Zeit für eine Manifestation der Erkrankungsschwere.

### 5.2 Vollblutanalyse

Zur Feststellung von Infektion und Krankheitsschwere wurde die Zahl der Leukozyten (WBC), Lymphozyten (LYM#), die Summe aus Monozyten, Basophilen, Eosinophilen (MXD#), Erythrozyten (RBC), Thrombozyten (PLT) und der Hämoglobingehalt (HGB) anhand des Blutbildes ausgewertet (Tab. 10, Abb. 12). Referenzwerte für gesunde Balb/c-Mäuse stammen von Charles-River-Laboratories (2008-12).

Bei der Betrachtung der Leukozytenzahl fiel mit späterem Untersuchungszeitpunkt ein deutlicher Anstieg auf, was mit der zunehmenden Inflammation, ausgelöst durch die Cholestase, einhergeht (Tab. 10). Nicht signifikant, jedoch leicht erhöht sind dabei die systemischen Leukozytenzahlen in der RvD1-behandelten Gruppe am 5. und 14. postoperativen Tag im Vergleich zur Kontrollgruppe (Tab. 10). Bei den Lymphozyten war ein mit der

Zeit tendenzieller Abfall der Zellzahlen zu beobachten, der in der Kontrollgruppe etwas stärker ausfiel (Tab. 10). Die als Gruppe zusammengefassten Monozyten, Eosinophilen und Basophilen zeigten bereits ab dem 2. postoperativen Tag Werte, die die Referenzwerte bis um das Vierfache übertrafen (Abb. 12a). Macht man sich dabei bewusst, dass die Monozyten zusammen mit verschiedenen Zellen, u.a. auch Makrophagen, das Mononukleäre-phagozytäre System bilden, verdeutlicht dies die zunehmende Inflammation während der Fibrogenese.

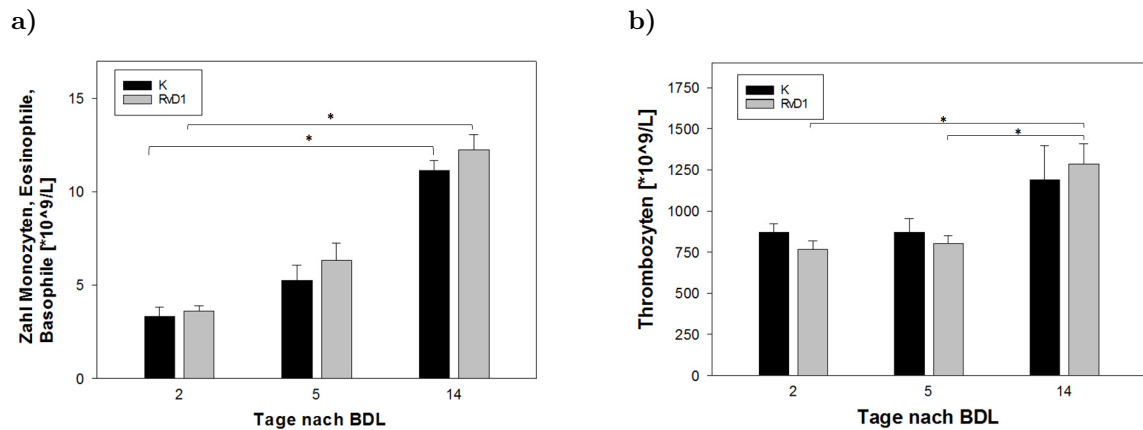


Abb. 12: a) Anzahl der Monozyten, Basophilen, Eosinophilen und b) Anzahl der Thrombozyten der Kontrollgruppe (K) und RvD1-behandelten Versuchsgruppe (RvD1) 2, 5 und 14 Tage nach BDL. Mittelwert  $\pm$  SEM (n=10 pro Gruppe und Zeitpunkt). One way ANOVA; \*p < 0,05

Bei den Erythrozytenzahlen, dem Hämoglobingehalt und dem Hämatokrit lagen die Werte im physiologischen Bereich und es waren keine Unterschiede zwischen den Zeitpunkten und Gruppen zu beobachten. Die Zahl der Thrombozyten stieg in beiden Gruppen zum 14. Tag hin leicht an (Abb. 12b), wobei diese immer noch im physiologischen Bereich lagen (Tab. 10).

Tabelle 10: Vollblutanalyse (MW $\pm$ SEM, n=10 pro Gruppe und Zeitpunkt)[WBC = Leukozyten, RBC = Erythrozyten, PLT = Thrombozyten, HGB = Hämoglobingehalt, LYM# = Lymphozyten, MXD# = Summe aus Monozyten, Basophile, Eosinophile, physiologische Werte von Charles-River-Laboratories, 2012]  
One way ANOVA; p < 0,05 # vs. K 14d, p < 0,05 \* vs. Rv 14d

	physiologisch	K 2d	Rv 2d	K 5d	Rv 5d	K 14d	Rv 14d
WBC [10 <sup>9</sup> /l]	8,62 (3,48-14,03)	5,26 $\pm$ 1,29#	5,85 $\pm$ 0,56 *	7,26 $\pm$ 1,00#	9,14 $\pm$ 0,94 *	11,51 $\pm$ 1,04	14,05 $\pm$ 0,78
LYM# [10 <sup>9</sup> /l]	5,90 (2,22-9,83)	2,25 $\pm$ 0,56	2,12 $\pm$ 0,46	1,80 $\pm$ 0,39	2,68 $\pm$ 0,39	0,91 $\pm$ 0,28	1,65 $\pm$ 0,39
MXD# [10 <sup>9</sup> /l]	0,71 (0,22-1,92)	3,31 $\pm$ 0,53#	3,61 $\pm$ 0,29 *	5,26 $\pm$ 0,81	6,33 $\pm$ 0,93	11,15 $\pm$ 0,53	12,24 $\pm$ 0,85
RBC [10 <sup>12</sup> /l]	10,09 (6,93-12,24)	8,82 $\pm$ 0,33	10,07 $\pm$ 0,39	10,20 $\pm$ 0,63	10,28 $\pm$ 0,38	8,51 $\pm$ 0,32	9,22 $\pm$ 0,71
HGB [mmol/l]	9,69 (7,82-12,73)	8,78 $\pm$ 0,16	10,08 $\pm$ 0,58	10,03 $\pm$ 0,62	10,07 $\pm$ 0,37	8,2 $\pm$ 0,35	8,84 $\pm$ 0,66
PLT [10 <sup>9</sup> /l]	1007 (420-1698)	870 $\pm$ 52,08	768 $\pm$ 48,96 *	870,70 $\pm$ 85,23	801,80 $\pm$ 47,53 *	1189,30 $\pm$ 206,78	1284,80 $\pm$ 124,54

### 5.3 Leberschaden

Der durch die Cholestase verursachte Leberschaden wurde anhand der Aktivitäten der Leberfunktionsenzyme ALT, AST und GLDH im Plasma bestimmt (Abb. 13a, Tab. 11). Zum anderen wurden die Cholestaseparameter Bilirubin und AP erhoben, die mit zunehmendem Gallenrückstau ansteigen (Herold, 2016) und somit zusätzlich auch der Überprüfung der erfolgreichen BDL dienen (Abb. 13b, Tab. 11). In beiden Versuchsgruppen kam es

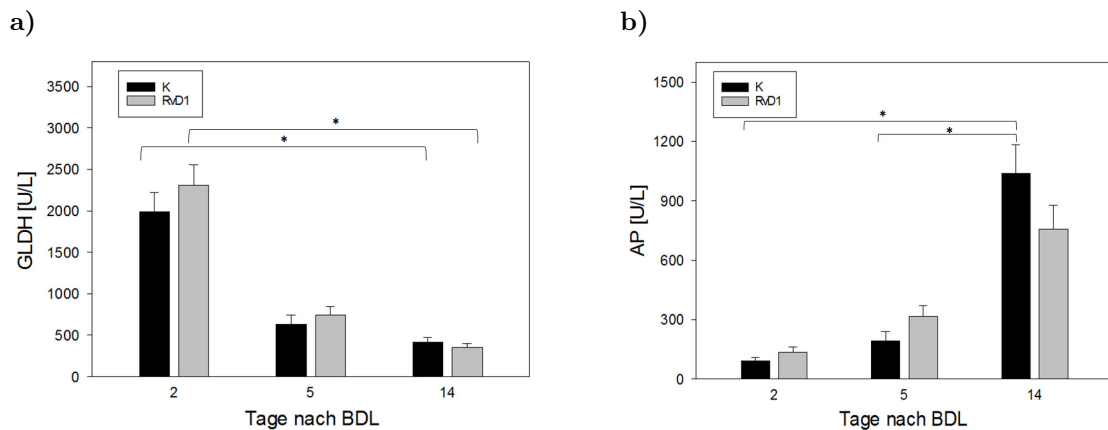


Abb. 13: Plasmaaktivitäten von a) GLDH und b) AP der Kontrollgruppe (K) und der RvD1-behandelten Gruppe (RvD1) 2, 5 und 14 Tage nach BDL. Mittelwert  $\pm$  SEM (n=10 pro Gruppe und Zeitpunkt). One way ANOVA; \*p < 0,05

zu einem sehr starken BDL-induzierten Anstieg der Leberenzyme ALT, AST (Tab. 11) und GLDH (Abb. 13a) mit Werten bis zu 10 mal höher als die Referenzwerte. Während der Progression der Lebererkrankung fielen diese Werte wieder bis auf 20-40 % der Ausgangswerte ab (Abb. 13a), was ein „Ausbrennen“ der Leber und somit eine massive Leberschädigung repräsentiert. Die Cholestaseparameter AP und Bilirubin stiegen, wie zu erwarten, zu den späteren Untersuchungszeitpunkten deutlich an. Während die AP in der Kontrollgruppe am Tag 14 das 10-fache der Ausgangswerte von gesunden Mäusen erreichte, war es in der RvD1-Gruppe nur ein 5- bis 6-facher Anstieg (Abb. 13b). Mittels H.E.-gefärbter Schnitte wurde zusätzlich die Leberschädigung histologisch analysiert (Abb. 14). Die Auswertung der nekrotischen Gewebefläche (Galleninfarkte) ergab große individuelle Unterschiede innerhalb einer Gruppe. So ließ sich eine Zunahme der Gewebse nekrosen mit der Zeit nach BDL nur tendentiell beobachten (Abb. 14).



Tabelle 11: Plasmaanalyse (MW $\pm$ SEM, n=10 pro Gruppe und Zeitpunkt)[ALT = Alanin-Aminotransferase, AP = Alkalische Phosphatase, AST = Aspartat-Aminotransferase, Bili = direktes Bilirubin, GLDH = Glutamat-Dehydrogenase, physiologische Werte von Charles-River-Laboratories, 2012]

Signifikanzen One way ANOVA; p < 0,05 # vs. K 14d, p < 0,05 \* vs. Rv 14d

	phys.	K 2d	Rv 2d	K 5d	Rv 5d	K 14d	Rv 14d
ALT [U/l]	60 (41-131)	1330,80 $\pm$ 181,34#	1336,90 $\pm$ 215,66 *	709,44 $\pm$ 134,46	765,11 $\pm$ 61,12	591,44 $\pm$ 81,73	519,63 $\pm$ 28,23
AST [U/l]	135 (55-352)	898,20 $\pm$ 80,05	913,90 $\pm$ 92,09 *	567,33 $\pm$ 113,03	836,30 $\pm$ 90,39	706,88 $\pm$ 43,38	492,78 $\pm$ 28,87
GLDH [U/l]	6 (4-13)	1987,50 $\pm$ 234,24#	2308,00 $\pm$ 245,50 *	634,44 $\pm$ 112,83	745,80 $\pm$ 98,91	415,30 $\pm$ 53,81	354,00 $\pm$ 45,81
AP [U/l]	180 (118-433)	90,30 $\pm$ 16,94#	135,90 $\pm$ 24,75 *	191,90 $\pm$ 46,07#	317,30 $\pm$ 51,63	1038,10 $\pm$ 146,24	757,40 $\pm$ 119,05
Bili [ $\mu$ mol/l]	10 (8-13)	129 $\pm$ 20,79#	134,80 $\pm$ 16,61 *	183,89 $\pm$ 29,62#	213,50 $\pm$ 16,16	310,78 $\pm$ 22,69	256,80 $\pm$ 21,21

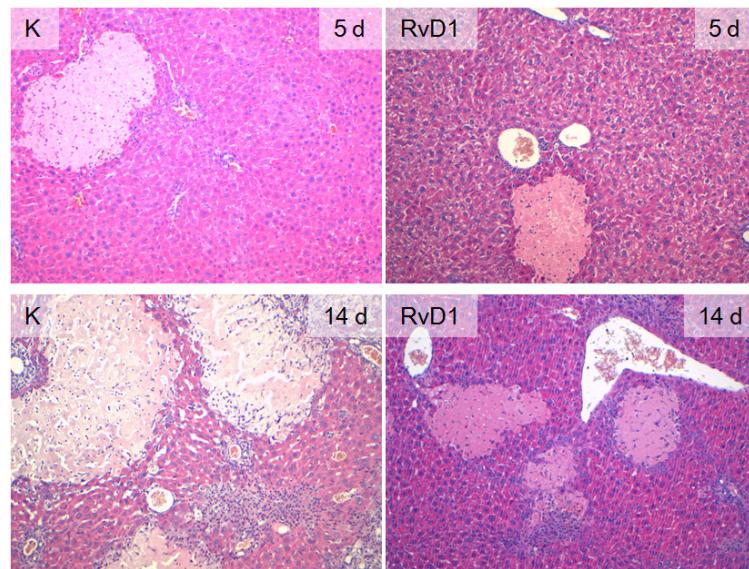


Abb. 14: Repräsentative Bilder der H.E.-gefärbten Leberschnitte der Kontrollgruppe (K) und RvD1-behandelten Versuchsgruppe (RvD1) 5 und 14 Tage nach BDL, Vergrößerung: 100x

Zusammenfassend kann der Leberschaden in beiden Gruppen als sehr stark und progredient beurteilt werden. Hervorzuheben ist hierbei der deutlich geringere Anstieg des Cholestaseparameters AP in der RvD1-Gruppe am Tag 14 nach BDL, welcher jedoch nicht signifikant war.

## 5.4 Inflammation

Um das Ausmaß der Inflammation umfassend zu charakterisieren, wurden neben den systemischen Leukozytenzahlen, neutrophile Granulozyten mittels CAE- und Gewebsmakrophagen mittels F4/80-Färbung des Lebergewebes analysiert. Desweiteren wurden die Expression von F4/80 und CD206 mittels RT-PCR analysiert. Zusätzlich wurden pro- und anti-inflammatorische Zytokine im Plasma mittels eines Multiplex-Zytokin-ELISAs und die TNF- $\alpha$ -Expression via RT-PCR bestimmt. Zunächst sei noch einmal auf die systemischen Leukozytenzahlen hingewiesen, bei denen zunehmende Zellzahlen mit fortlaufender Zeit beobachtet wurden, wobei zum Zeitpunkt 14 Tage nach BDL die RvD1-Gruppe leicht höhere Zahlen aufwies als die Kontrollgruppe (Abb. 15).

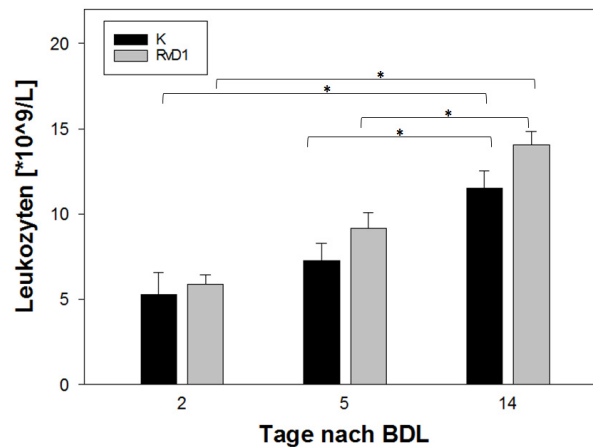


Abb. 15: Zahl der systemischen Leukozyten [ $10^9/l$ ] der Kontrollgruppe (K) und RvD1-behandelten Versuchsgruppe (RvD1) 2, 5 und 14 Tage nach BDL. Mittelwert  $\pm$  SEM (n=10 pro Gruppe und Zeitpunkt). One way ANOVA; \*p < 0,05

Ausschlaggebend für den Beginn einer Entzündungsreaktion sind unspezifische Zellen des Immunsystems, wie z.B. Granulozyten. Mittels CAE-Färbung wurde indirekt auf die Aktivität dieser geschlossen (Abb. 16b). Auch hier zeigte sich ein ähnliches Muster wie bei den systemischen Leukozytenzahlen. Mit zunehmender Leberschädigung bzw. Fibrosierung stiegen die Granulozytenzahlen an (Abb. 16a). Dies lässt auf eine dauerhafte Manifestation der Inflammation schließen. Hierbei sind keine nennenswerten Gruppenunterschiede zu beobachten.

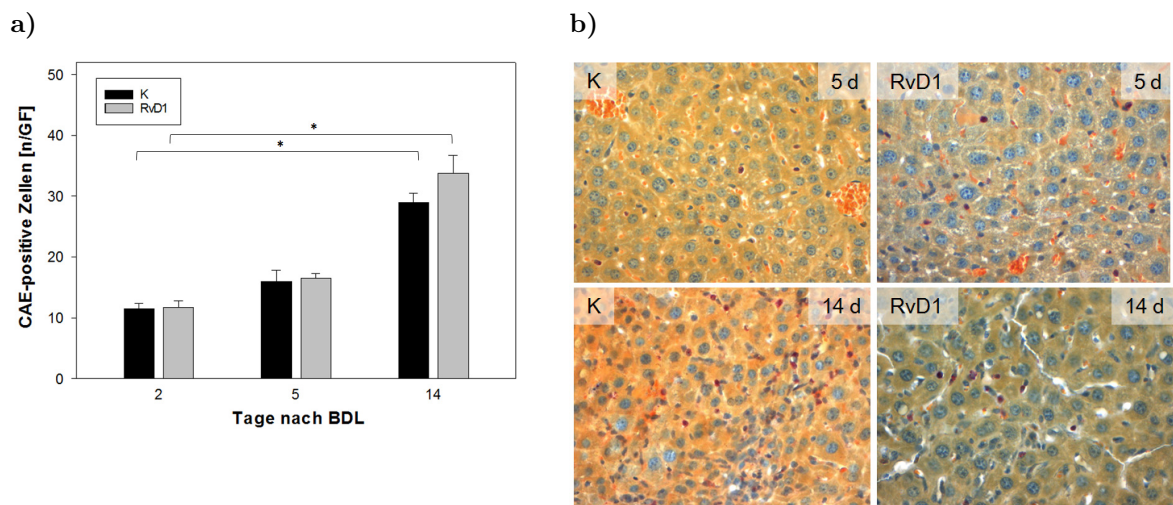


Abb. 16: a) Anzahl CAE-positiver Zellen in Leberschnitten der Kontrollgruppe (K) und RvD1-behandelten Versuchsgruppe (RvD1) 2, 5 und 14 Tage nach BDL. Mittelwert  $\pm$  SEM (n=10 pro Gruppe und Zeitpunkt). One way ANOVA; \*p < 0,05  
b) Repräsentative Bilder CAE-gefärbter Leberschnitte der Kontrollgruppe (K) und RvD1-behandelten Versuchsgruppe (RvD1) 5 und 14 Tage nach BDL, Vergrößerung: 400x

Die Auszählung F4/80-positiver Zellen ergab einen kontinuierlichen Anstieg von Makrophagen mit zunehmender Fibrosierung der Leber (Abb. 17, 18). Die RvD1-Gruppe wies in der immunhistochemischen Färbung am 14. Tag nach BDL eine ca. um 30 % höhere Makrophagenzahl auf als die Kontrollgruppe, was jedoch nicht signifikant war. Dieser Effekt konnte ebenfalls in der RT-PCR verifiziert werden (Abb. 18a). Zur Quantifizierung der anti-Inflammation wurden die M2-Makrophagen mittels RT-PCR mit Hilfe von CD206 nachgewiesen. Sowohl in der Kontrollgruppe als auch in der RvD1-behandelten Gruppe konnte ein Anstieg der relativen CD206-mRNA-Expression über den Versuchszeitraum beobachtet werden (Abb. 18b). Es ließ sich zwischen den Gruppen kein signifikanter Unterschied in der CD206-mRNA-Expression finden.

Schließlich wurden verschiedene, für die Inflammation relevante, Zytokine aus dem Plasma mittels eines Multiplex-Zytokin-ELISA untersucht. Dabei wurden u.a. pro-inflammatorische Zytokine wie IL-18, MCP-1, IL-6, TNF- $\alpha$  und anti-inflammatorische Proteine wie TGF- $\beta$  und IL-10 analysiert (Abb. 19 und 20, Tab. 12).

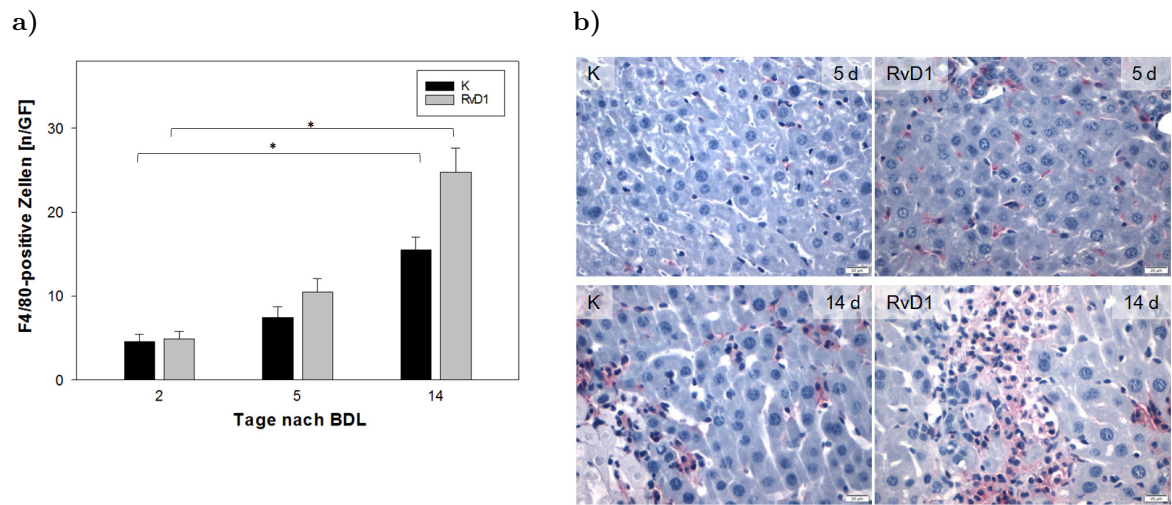


Abb. 17: a) Anzahl F4/80-positiver Zellen in Leberschnitten der Kontrollgruppe (K) und RvD1-behandelten Versuchsgruppe (RvD1) 2, 5 und 14 Tage nach BDL. Mittelwert  $\pm$  SEM (n=10 pro Gruppe und Zeitpunkt). One way ANOVA; \*p < 0,05  
b) Repräsentative Bilder F4/80-gefärbter Leberschnitte der Kontrollgruppe (K) und RvD1-behandelten Versuchsgruppe (RvD1) 5 und 14 Tage nach BDL, Vergrößerung: 400x

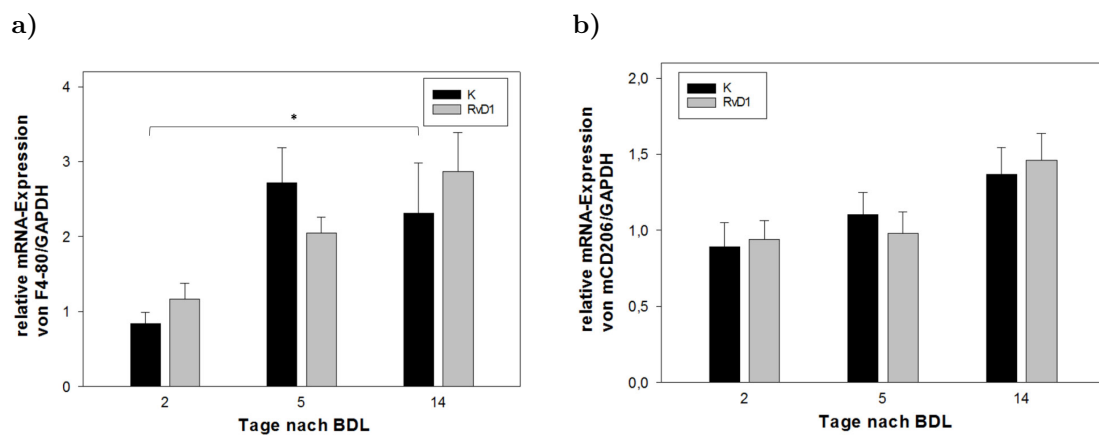


Abb. 18: Relative hepatische mRNA-Expression von a) F4/80 und b) CD206 in der Kontrollgruppe (K) und RvD1-behandelten Versuchsgruppe (RvD1) 2, 5 und 14 Tage nach BDL. Die mRNA-Expression wurde auf die Expression des Housekeepinggens GAPDH relativiert. Mittelwert  $\pm$  SEM (n=10 pro Gruppe und Zeitpunkt). One way ANOVA; \*p < 0,05

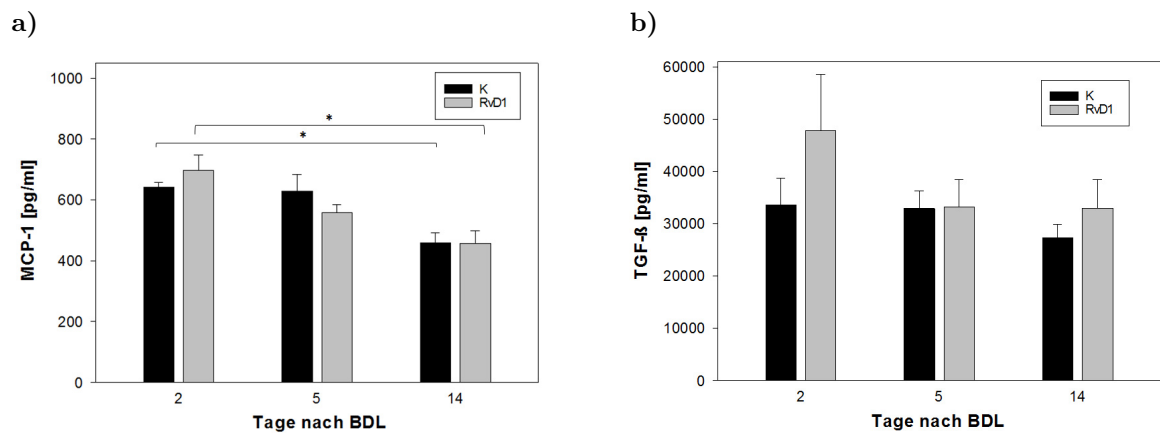


Abb. 19: Plasmakonzentrationen von a) MCP-1, b) TGF-β, der Kontrollgruppe (K) und RvD1-behandelten Versuchsgruppe (RvD1) 2, 5 und 14 Tage nach BDL. Mittelwert  $\pm$  SEM (n=10 pro Gruppe und Zeitpunkt). One way ANOVA; \*p < 0,05

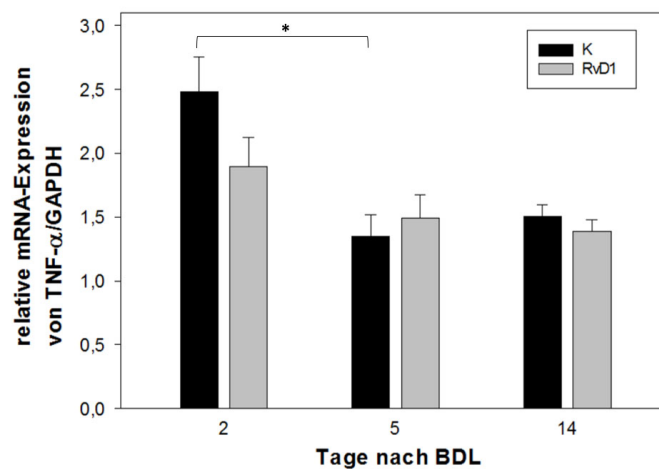


Abb. 20: Relative hepatische mRNA-Expression von TNF-α in der Kontrollgruppe (K) und RvD1-behandelten Versuchsgruppe (RvD1) 2, 5 und 14 Tage nach BDL. Die mRNA-Expression von TNF-α wurde auf die Expression des Housekeepinggens GAPDH relativiert. Mittelwert  $\pm$  SEM (n=10 pro Gruppe und Zeitpunkt). One way ANOVA; \*p < 0,05

Tabelle 12: Multiplex-Zytokin-ELISA (MW $\pm$ SEM, n=2-3 pro Gruppe und Zeitpunkt)[IL = Interleukin, MCP = Monocyte Chemoattractant Protein , TNF = Tumornekrosefaktor, PDGF-bb = Platelet Derived Growth Factor , TGF = Tumor Growth Factor, Referenz aus gesunden Balb/c-Kontrolltieren],  
keine Signifikanzen aufgrund geringer Zahl an auswertbaren Proben

	K 2d	Rv 2d	K 5d	Rv 5d	K 14d	Rv 14d
IL-1 $\beta$ [pg/ml]	247,8 $\pm$ 26,1	353,0 $\pm$ 31,9	240,3 $\pm$ 56,5	208,1 $\pm$ 33,7	239,3 $\pm$ 47,6	201,2 $\pm$ 28,3
IL-6 [pg/ml]	14,4 $\pm$ 1,7	15,2 $\pm$ 2,1	31,0 $\pm$ 9,2	26,9 $\pm$ 5,1	28,7 $\pm$ 3,0	43,1 $\pm$ 10,8
MCP-1 [pg/ml]	641,1 $\pm$ 17,3	697,4 $\pm$ 51,2	628,2 $\pm$ 55,7	558,1 $\pm$ 25,9	459,8 $\pm$ 32,4	456,6 $\pm$ 41,6
TNF- $\alpha$ [pg/ml]	422,9 $\pm$ 52,5	588,4 $\pm$ 69,7	350,5 $\pm$ 64,2	311,7 $\pm$ 45,4	299,8 $\pm$ 60,8	311,7 $\pm$ 56,5
IL-18 [pg/ml]	201,2 $\pm$ 22,5	215,1 $\pm$ 41,2	132,8 $\pm$ 26,4	101,6 $\pm$ 13,4	176,3 $\pm$ 47,4	124,0 $\pm$ 27,0
PDGF-bb [pg/ml]	9085,8 $\pm$ 1519,0	13973,2 $\pm$ 3688,6	6054,9 $\pm$ 1168,2	7787,8 $\pm$ 1879,3	6307,2 $\pm$ 1599,1	4616,0 $\pm$ 1288,0
IL-10 [pg/ml]	22,9 $\pm$ 5,1	18,9 $\pm$ 3,3	8,1 $\pm$ 3,5	7,7 $\pm$ 2,7	15,9 $\pm$ 7,3	12,0 $\pm$ 5,5
TGF- $\beta$ [pg/ml]	33541,6 $\pm$ 5111,3	47847,32 $\pm$ 10691,7	32897,5 $\pm$ 3397,7	33274,0 $\pm$ 5147,1	27328,7 $\pm$ 2498,2	32911,1 $\pm$ 5521,8

Alle Werte zeigten sich im Vergleich zu Kontrollen erhöht, bei denen die Zytokine in sehr geringen Konzentrationen und daher unter der Nachweisgrenze liegen. Hierbei konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen Kontroll- und RvD1-Gruppe beobachtet werden. Hinzuweisen sei auf die leicht erhöhte Konzentration des anti-inflammatorischen TGF- $\beta$  in der RvD1-Gruppe am 2. und 14. Tag (Abb. 19b). Die Auswertung der Multiplex-Ergebnisse gestaltete sich allgemein durch die geringe Zahl an auswertbaren Proben, aufgrund von zu geringen und damit nicht detektierbaren Konzentrationen und hohen Standardfehlern als besonders schwierig, sodass nur Trends, aber keine signifikanten Ergebnisse zu beobachten waren.

Zur weiteren Charakterisierung der Gewebeentzündung wurde das pro-inflammatorische Zytokin TNF- $\alpha$  mittels RT-PCR ausgewertet. Sowohl in der Kontrollgruppe als auch in der RvD1-behandelten Gruppe konnte ein Abfall der relativen TNF- $\alpha$ -mRNA-Expression über den Versuchszeitraum beobachtet werden (Abb. 20). Es ließ sich zwischen den Gruppen kein signifikanter Unterschied in der TNF- $\alpha$ -mRNA-Expression finden.

Zusammenfassend spiegeln alle analysierten Parameter eine mit der Zeit zunehmende Inflammation dar. Die erhöhte Makrophagenzahl am Tag 14 nach BDL in der RvD1-Gruppe könnte einen Hinweis für eine erhöhte Aktivität inflammatorischer Zellen darstellen.

## 5.5 Fibrose

Zur Beurteilung des fibrogenen Umbaus in der Leber wurden neben der Expression von Kollagen-1 $\alpha$  die Färbung nach Sirius-red zur Quantifizierung des Gesamtkollagens sowie die Proteinexpression von  $\alpha$ -SMA als Aktivierungsmarker für hepatische Sternzellen untersucht. Zudem wurde die Konzentration pro- bzw. anti-fibrotischer Zytokine im Blutplasma mittels Multiplex-Zytokin-ELISA bestimmt.

Die quantitative Auswertung der Kollagen-1 $\alpha$ -Immunhistochemie (Abb. 21b) ergab keine signifikanten Unterschiede zwischen den Versuchszeiträumen und Gruppen. Es sei jedoch auf die tendenziell erniedrigten Werte in allen RvD1-Gruppen hingewiesen (Abb. 21a), was auf eine geringere Fibrogenese schließt. Um dieses Ergebnis zu verifizieren, wurde die Expression von Kollagen-1 $\alpha$  zusätzlich mittels mRNA-Analyse untersucht. Sowohl in der



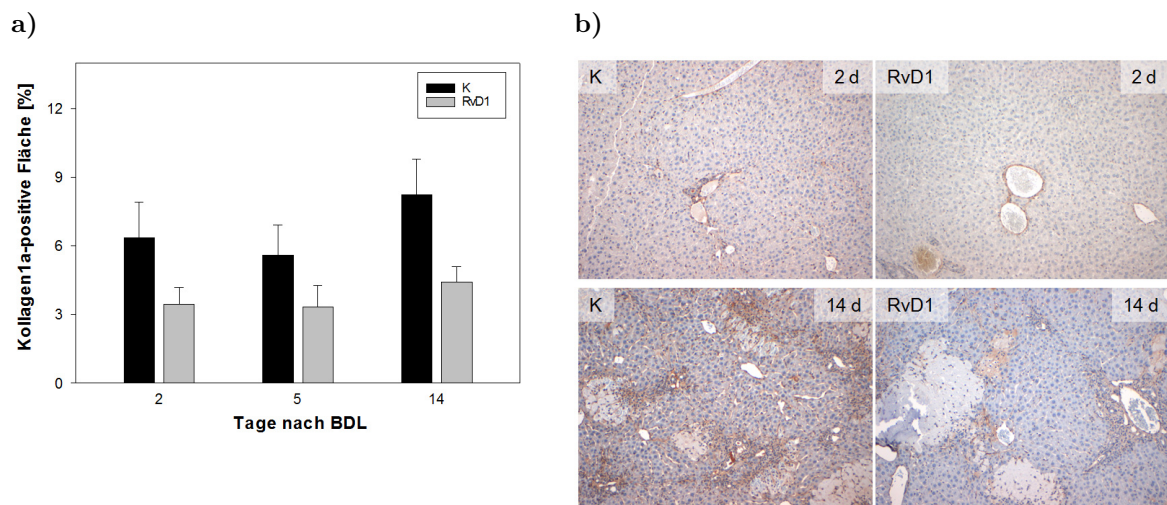


Abb. 21: a) Kollagen-1 $\alpha$ -positive Fläche [%] im Lebergewebe der Kontrollgruppe (K) und RvD1-behandelten Versuchsgruppe (RvD1) 2, 5 und 14 Tage nach BDL. Mittelwert  $\pm$  SEM (n=10 pro Gruppe und Zeitpunkt). One way ANOVA; \*p < 0,05  
b) Repräsentative Bilder der Kollagen-1 $\alpha$ -Immunhistochemie im Lebergewebe der Kontrollgruppe (K) und RvD1-behandelten Versuchsgruppe (RvD1) 2 und 14 Tage nach BDL, Vergrößerung: 100x

Kontrollgruppe als auch in der RvD1-behandelten Gruppe konnte ein starker Anstieg der relativen Kollagen-1 $\alpha$ -mRNA-Expression über den Versuchszeitraum beobachtet werden (Abb. 22a). In der Färbung nach Sirius-red (Abb. 23b) wird die Gesamtheit aller Kollagene erfasst, die am fibrotischen Umbau beteiligt sind. Es konnte ein leichter Anstieg der Kollagenmenge zum späteren postoperativen Untersuchungszeitpunkt beobachtet werden (Abb. 23a). Unterschiede zwischen der Kontroll- und RvD1-Gruppe wurden nicht erfasst. Die zusätzliche Analyse der Proteinexpression von  $\alpha$ -SMA, als Marker für aktive Myofibroblasten im Lebergewebe, ergab in beiden Versuchsgruppen eine starke Zunahme an Tag 14 nach BDL (Abb. 22b). Interessanterweise konnte in der RvD1-behandelten Gruppe am 2. und 14. postoperativen Tag eine deutlich geringere  $\alpha$ -SMA-Expression im Vergleich zur Kontrollgruppe beobachtet werden, die jedoch nicht signifikant war.

Schließlich wurden auch für die Fibrogenese bedeutsame Zytokine im Plasma untersucht (Abb. 24, Tab. 12).

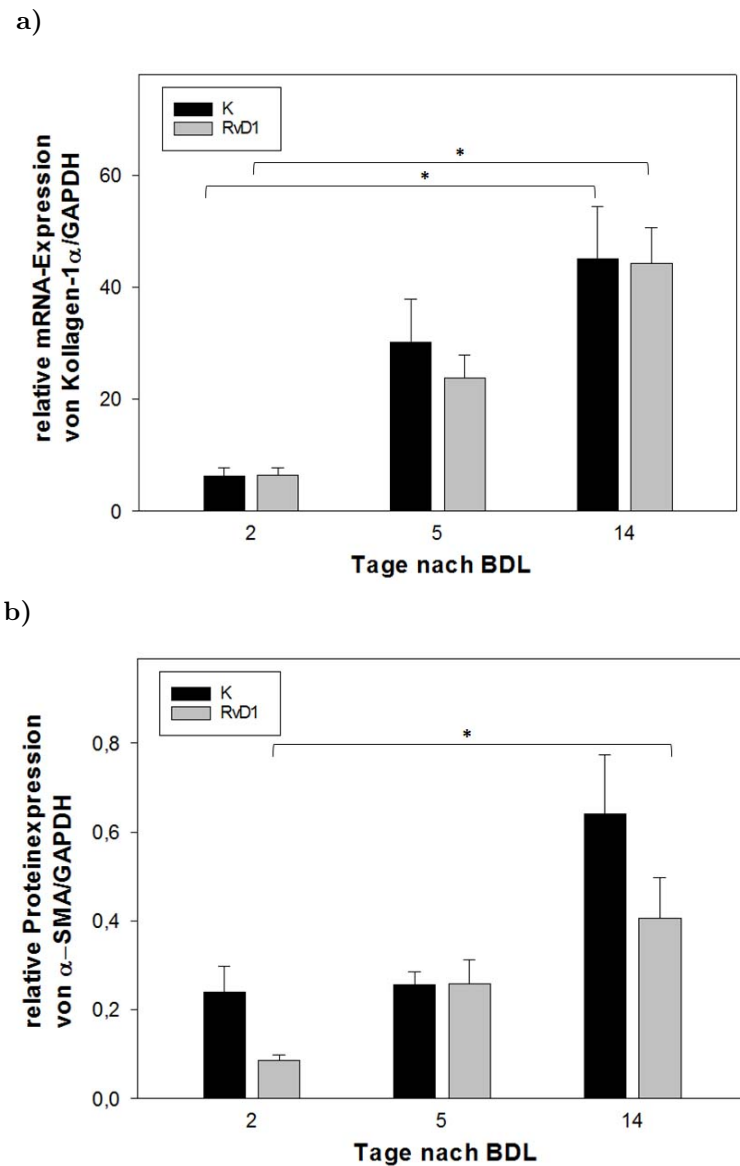


Abb. 22: a) Relative hepatische mRNA-Expression von Kollagen-1 $\alpha$  in der Kontrollgruppe (K) und RvD1-behandelten Versuchsgruppe (RvD1) 2, 5 und 14 Tage nach BDL. Die mRNA-Expression von Kollagen-1 $\alpha$  wurde auf die Expression des Housekeepinggens GAPDH relativiert. Mittelwert  $\pm$  SEM (n=10 pro Gruppe und Zeitpunkt). One way ANOVA; \*p < 0,05

b) Relative hepatische Proteinexpression von  $\alpha$ -SMA in der Kontrollgruppe (K) und RvD1-behandelten Versuchsgruppe (RvD1) 2, 5 und 14 Tage nach BDL. Die Protein-Expression von  $\alpha$ -SMA wurde auf die Expression des Housekeepinggens GAPDH relativiert. Mittelwert  $\pm$  SEM (n=10 pro Gruppe und Zeitpunkt).

One way ANOVA; \*p < 0,05

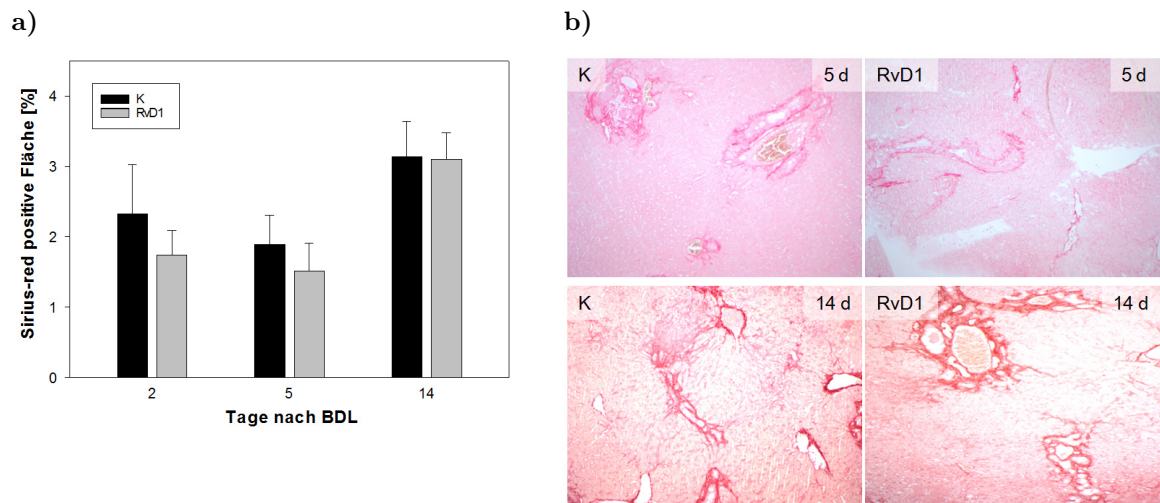


Abb. 23: a) Sirius-red-positive Fläche [%] der Kontrollgruppe (K) und RvD1-behandelten Versuchsgruppe (RvD1) 2, 5 und 14 Tage nach BDL. Mittelwert  $\pm$  SEM (n=10 pro Gruppe und Zeitpunkt). One way ANOVA; \*p < 0,05

b) Repräsentative Bilder Sirius-red-positiver Leberschnitte der Kontrollgruppe (K) und RvD1-behandelten Versuchsgruppe (RvD1) 5 und 14 Tage nach BDL, Vergrößerung: 100x

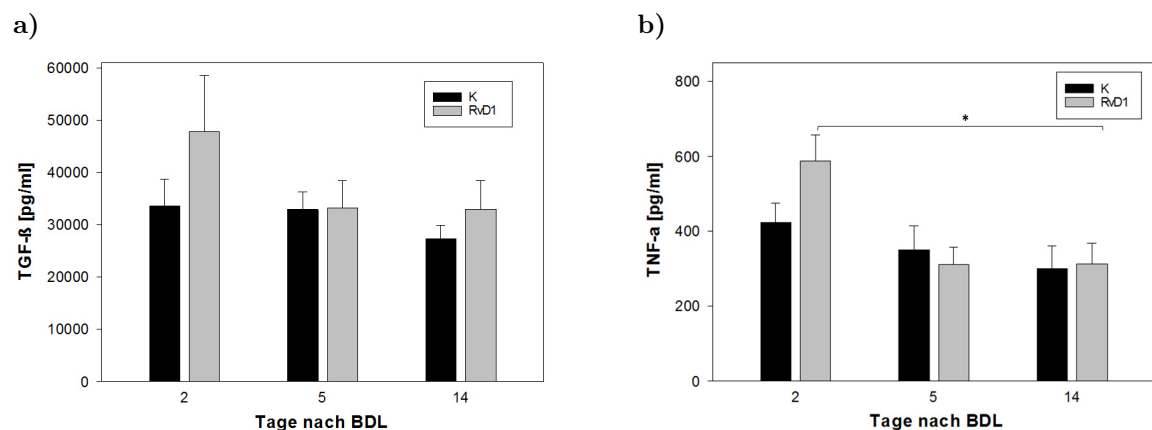


Abb. 24: Plasmakonzentrationen von a) TGF- $\beta$ , b) TNF- $\alpha$ , der Kontrollgruppe (K) und RvD1-behandelten Versuchsgruppe (RvD1) 2, 5 und 14 Tage nach BDL. Mittelwert  $\pm$  SEM (n=10 pro Gruppe und Zeitpunkt). One way ANOVA; \*p < 0,05

Wie bereits im Ergebnisteil zur Inflammation beschrieben, sind auch diese Ergebnisse aufgrund der geringen Zahl an auswertbaren Proben wenig aussagekräftig. Hierbei waren bei allen profibrotischen Zytokinen tendenziell Abfälle, allerdings ohne Unterschiede zwischen Zeitpunkten und Gruppen, zu beobachten. Zusammenfassend lässt sich ein Anstieg der fibrotischen Parameter während der Fibrosierung bei beiden Gruppen beobachten. Tendenziell zeigt sich in der RvD1-behandelten Gruppe eine Abnahme der Kollagen-1 $\alpha$ -Menge sowie eine geringere Proteinexpression von  $\alpha$ -SMA.

## 5.6 Proliferation

Die Proliferation von Parenchym- (Abb. 26a) und Nichtparenchymzellen (Abb. 26b) wurde mittels des Einbaus von BrdU (Abb. 25) in die DNA immunhistochemisch erfasst.

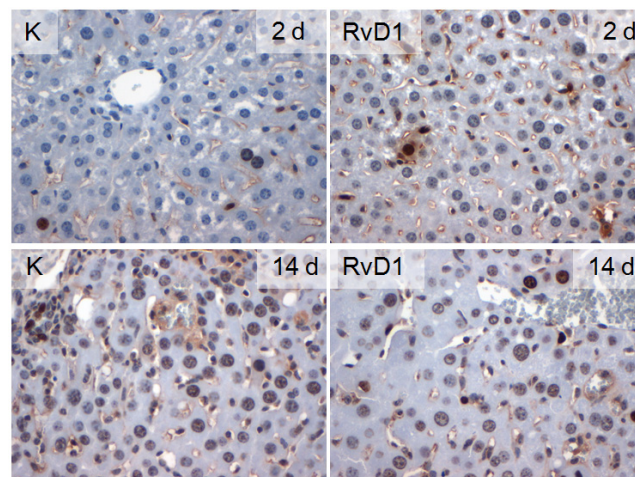


Abb. 25: Repräsentative Bilder BrdU-positiver Leberschnitte der Kontrollgruppe (K) und RvD1-behandelten Versuchsgruppe (RvD1) 2 und 14 Tage nach BDL, Vergrößerung: 400x

Die quantitative Auswertung ergab eine kontinuierlich zunehmende Anzahl BrdU-positiver Hepatozyten als auch Nicht-Parenchymzellen im Verlauf der Progression der Leberfibrose (Abb. 26). Zwischen den Versuchsgruppen gab es jedoch keine signifikanten Unterschiede, wobei an Tag 14 in der RvD1-behandelten Gruppe etwas weniger proliferierende Hepatozyten beobachtet wurden (Abb. 26).

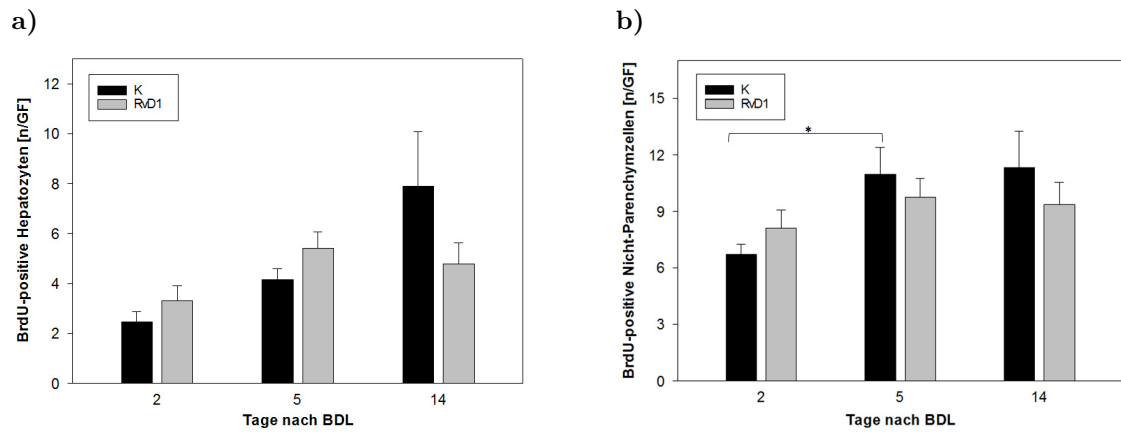


Abb. 26: Anzahl BrdU-positiver a) Hepatozyten und b) Nicht-Parenchymzellen in der Kontrollgruppe (K) und RvD1-behandelten Versuchsgruppe (RvD1) 2, 5 und 14 Tage nach BDL. Mittelwert  $\pm$  SEM (n=10 pro Gruppe und Zeitpunkt).

One way ANOVA; \*p < 0,05

## 6 Diskussion

### 6.1 Diskussion von Material und Methoden

Die einzige langfristig kurative Therapie chronischer Lebererkrankungen ist derzeit die allogene Lebertransplantation. Jährlich werden 5500 Lebertransplantationen in Europa durchgeführt. Dem gegenübergestellt sterben über 170.000 Erkrankte jedes Jahr an einer chronischen Lebererkrankung (Blachier et al., 2013). Dies zeigt, wie groß das Missverhältnis von verfügbaren und erforderlichen Spendeorganen ist. Neben einer erweiterten Aufklärung der Bevölkerung zur vermehrten Spendebereitschaft bei Hirntoddiagnostik und der Erforschung individueller Organzüchtungen aus autologen Stammzellen stellt nur die Entwicklung kurativer Therapien des geschädigten Organs eine Alternative dar. Chronische Lebererkrankungen sind auch sozioökonomisch ein großes Problem, da sie das Gesundheitssystem mit hohen Kosten belasten. In einer Studie des Robert-Koch-Instituts wurde für die Mitte der 1990er Jahre berechnet, dass die Ausgaben alkoholassoziierter Erkrankungen 1,13 % des Bruttosozialproduktes in Deutschland entsprachen (Bergmann und Horch, 2002). Allein die Kosten für eine Lebertransplantation liegen durchschnittlich bei 40.000 bis 80.000 € pro Operation (Eurotransplant, 2016), hinzu kommen die Nachsorge, evtl. Komplikationsbehandlungen und die Kosten für ausfallende Arbeitskraft, fehlende Versicherungsbeiträge und vieles mehr, was einen enormen volkswirtschaftlichen Schaden verursacht.

Um kostengünstigere Therapien als Alternative zur Lebertransplantation zu entwickeln, zählen Tierexperimente heute als gängiges Mittel der Forschung. Grundsätzlich sind Tierexperimente immer kritischen und ethischen Kontroversen unterlegen. Die Frage nach Verwendbarkeit von Methoden und Ergebnissen in Bezug auf ihre Übertragung auf die humane Situation ist berechtigt, da jede Spezies, ob Tier oder Mensch, unterschiedlichen systemischen Prozessen unterliegt. Ein Tiermodell ist jedoch die einzige, derzeit anwendbare Möglichkeit, die einem menschlichen System nahekommt. Es kann mit größtem Erfolg helfen, molekulare Prozesse systematisch zu verstehen und die Grundlage für Studien am Menschen zu schaffen. Deshalb wurde die vorliegende Fragestellung in einem *in-*

*vivo*-Modell bearbeitet. Reine *in-vitro*-Versuchsreihen sind derzeit nicht in der Lage, die Komplexität von Erkrankungen umfangreich darzustellen. Mäuse sind geeignete Versuchstiere, da sie genetisch zu über 95 % mit dem menschlichen Genom übereinstimmen, leicht züchtbar sind, einen kurzen Lebenszyklus von zwei bis drei Jahren aufweisen und über ein belastungsfähiges Immunsystem verfügen (Max-Planck-Gesellschaft, München, 2017). Der in dieser Studie verwendete Balb/c-Stamm ist ein etablierter Inzucht-Mausstamm, der in zahlreichen Studien zur Leber verwendet wird, da er auf lebertoxische Reize besonders sensibel reagiert und modellübergreifend die ausgeprägtesten Leberfibrosen entwickelt (Battaller und Brenner, 2005; Iredale et al., 2017).

Die aktuelle Forschung zur Leberfibrose umfasst je nach Genese verschiedene Modelle (Abb. 27). Fibrose kann dabei auf unterschiedliche Weise induziert werden: toxisch, diätisch, chirurgisch oder genetisch. Die Gabe von Toxinen, wie Tetrachlormethan ( $\text{CCl}_4$ ), Thioacetamid (TAA) oder Dimethylnitrosamin (DMN) kann durch Auslösung einer Entzündungskaskade zur Fibrosierung führen (Chen et al., 2016).  $\text{CCl}_4$  wird in der Leber metabolisiert und führt über das Cytochrom P450 zu einem Anstieg von ROS, der in einer massiven Gewebsnekrose resultiert (Khan et al., 2012; Liedtke et al., 2013). Nachteile des  $\text{CCl}_4$ -Modells sind der zeitliche Aufwand bis zur Fibrosierung, die höheren Kosten, sowie der vermehrte Pflegeaufwand (Arthur, 2000; Liedtke et al., 2013). Das Toxin kann zudem die hepatische Proliferation durch massive Inflammation beeinflussen (Weiskirchen und Tacke, 2014). Ebenfalls kann eine Fibrose diätisch durch besonders fettreiche Ernährung induziert werden. So werden z.B. Methionin-Cholin-arme (MCD) Ernährungsprotokolle verwendet, um eine NASH auszulösen (Winkler et al., 2014). Diese Modelle haben den Vorteil, dass sie kostengünstig und nicht invasiv sind, somit das Entzündungsrisiko minimieren, und die Ergebnisse eine gute Vergleichbarkeit mit NAFLD aufweisen. Gegen das Modell sprechen eine längere Versuchsdauer bis zur Etablierung der Fibrose und ein höherer Pflegeaufwand. Andere Modelle nutzen die Ausschaltung protektiver Gene (Knockout oder transgene Mäuse) (Liedtke et al., 2013). Diese Modelle weisen eine hohe Präzision in der Auslösung der Krankheit auf und sind gut vergleichbar mit hereditären Lebererkrankungen beim Menschen (Liedtke et al., 2013). So werden z.B. Knockout-Mäuse

mit einem defekten HFE-Gen gezielt eingesetzt, um die Pathomechanismen der hereditären Hämochromatose besser zu verstehen (Levy et al., 2000) (siehe 3.1.3). Nachteile dieser Modelle sind v.a. die hohen Kosten.

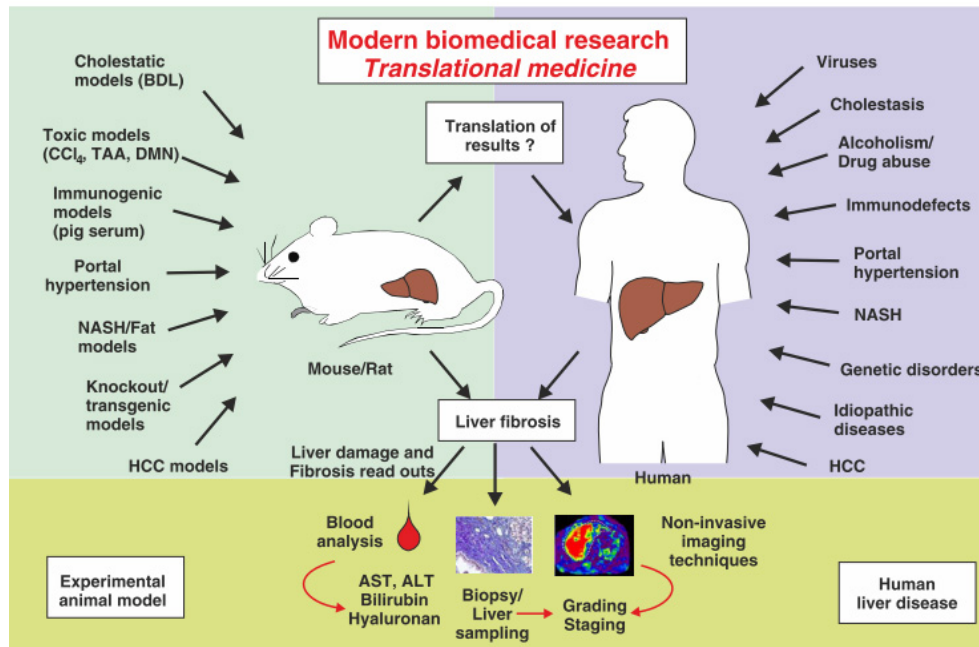


Abb. 27: Forschungsmodelle der Leberfibrose (Liedtke et al., 2013)

Am häufigsten werden chirurgische Modelle zur Induktion einer Leberfibrose verwendet (Liedtke et al., 2013). Dazu gehört die BDL, die eine extrahepatische Cholestase verursacht. Typisches Anzeichen von ersten cholestatischen Veränderungen ist ein ikterischer Verlauf (Herold, 2016). Bei der BDL führt eine Ligatur des Gallenganges zum Rückstau der Galle in die Leber (Abshagen et al., 2015). Sie stellt sich als eine sehr sinnvolle, schnell reproduzierbare Methode dar. Eine kurze OP-Zeit, das schnelle Erlernen der Technik, die eher niedrigen Kosten und die makroskopische Überprüfbarkeit des ikterischen Verlaufs, die einen Erfolg der BDL bestätigen, sind weitere Vorteile dieses Modells. Nachteile der BDL sind die sehr unterschiedlich starke Dilatation der Gallenblase durch Rückstau und die damit einhergehende individuelle Schädigung des Lebergewebes durch die Galle sowie die Gefahr einer Perforation der Gallenblase mit anschließender tödlicher Peritonitis. Dieses Problem wäre durch eine zusätzliche Cholecystektomie oder der Verwendung von Ratten als Versuchstiere zu beheben, da diese über keine Gallenblase verfügen (Tag et al.,



2015). Zudem kommt das Modell der BDL nur dem Vergleich der humanmedizinisch bedeutsamen cholestatischen Ätiologie nahe, ausgelöst z.B. durch Gallensteine, Tumore oder Zysten. Andere Ätiologien wie chronischer Alkoholkonsum, Fettlebererkrankungen oder Virushepatitiden werden hier nicht berücksichtigt. Therapeutische Effekte von Substanzen sollten daher in Modellen verschiedenster Ätiologien untersucht werden.

Das zur Operation verwendete Anästhetikum Isofluran kann bei mehrfacher Anwendung zu einem Transaminasenanstieg führen (Safari et al., 2014). Da es allerdings nur einmalig zur BDL verwendet und die beeinflussende Dosis somit nicht erreicht wurde, ist dieser Effekt zu vernachlässigen. Die tägliche i.p.-Injektion von RvD1 ist notwendig, um eine dauerhafte Dosiserhaltung im Versuchstier zu gewährleisten. Die i.p.-Punktion sollte im unteren Drittel des rechten Unterbauches in einem Winkel von 10° bis 30° erfolgen, um Perforationen von Bauchorganen (z.B. Milz, Leber, Darm, Harnblase) zu vermeiden (Council, 2011). Durch diese Applikationsart ist es möglich, große Menge von ca. 10 ml/kg KG in das Tier zu injizieren (Dülsner et al., 2017). Die Verteilungsgeschwindigkeit der i.p.-Injektion ist geringer als die der i.v.-Applikation, jedoch einer oralen Gabe überlegen (Dülsner et al., 2017). Obwohl es sich um eine parenterale Applikation handelt, erfolgt die Absorption von RvD1 über die Mesenterialgefäße und gelangt anschließend in den gewünschten Wirkungsort, die Leber, und den Pfortaderkreislauf (Lukas et al., 1971), bevor es systemisch wirken kann. Die regelmäßigen Injektionen können dabei zur Entstehung von Peritonitiden, Verwachsungen und Fremdkörpergranulomen führen (Dülsner et al., 2017). Diese Risiken wurden jedoch durch Verwendung neuer, sauberer Spritzen minimiert. Die Pharmakokinetik der Substanz wird auch durch die Bioverfügbarkeit als AUC (Area under the curve) definiert und über die metabolische Verstoffwechselung durch die Leber beim ersten systemischen Durchlauf (first pass effect) (Aktories et al., 2013) bestimmt. Nach Angaben von Recchiuti et al. (2014) beträgt die Halbwertszeit von RvD1 etwa 3 h, was einen Injektionsrhythmus von 12 - 24 h erfordert. Wir verabreichten 2 ng RvD1 pro g KG pro Tag, somit im Durchschnitt ca. 40 ng pro Tier und Tag. Zur Festlegung dieser täglichen RvD1-Dosis orientierten wir uns an Angaben in der Literatur, welche von 0.5 bis 5 ng/g KG schwanken (Bannenberg und Serhan, 2010; Friedman und

Serhan, 2011; Recchiuti et al., 2014). Xu et al. (2010) zeigten, dass sowohl bei RvE1 als auch bei RvD1 bereits Wirkungen ab 0,2 ng pro Tier anti-inflammatorische Effekte auftreten. Höhere Dosen erbrachten dabei nur Verstärkungen dieser Wirkungen (Liu et al., 2016). Der Hersteller von RvD1 beschreibt Wirkungen in Mausmodellen bei Gabe von 10 bis 100 ng pro Maus unabhängig vom Körpergewicht (Biomol, 2018). Im Unterschied dazu gibt es Arbeitsgruppen, die nur Effekte von RvD1 in deutlich höheren Mengen, etwa im µg-Bereich, nachweisen konnten (Arita et al., 2005; Kuang et al., 2016; Neuhofer et al., 2013; Rius et al., 2014). Aus diesen diskrepanten Werten wird deutlich, dass RvD1 über einen ausreichend langen Zeitraum gegeben werden muss, um nachhaltige Wirkungen im Versuchsorganismus auszulösen.

Die Auswahl der Untersuchungszeitpunkte nach BDL erfolgte entsprechend der Fachliteratur (Georgiev et al., 2008) und bisheriger Studien der Arbeitsgruppe Abshagen (Abshagen et al., 2015). Die Zeitpunkte charakterisieren spezifische Ereignisse während der Fibrogenese: Am 2. Tag nach BDL kommt es zur Initiation der HSC-Aktivierung und einer beginnenden Entzündungsreaktion. Am 5. Tag nach BDL sind bereits Kollagenablagerungen und eine Fibrosierung bzw. Vernarbung des Gewebes nachweisbar. Am 14. Tag ist ein Maximum in der Bildung fokaler Nekrosen zu beobachten. Längere Untersuchungszeiträume erhöhen die Letalität massiv, weil sich Infektionsrisiko, Perforationsgefahr und Leberschädigung potenzieren (Georgiev et al., 2008).

Die schnelle, gekühlte Blut- und Gewebeentnahme zu den finalen Zeitpunkten ermöglicht eine fehlerfreie, aussagekräftige Auswertung der Proben für den Zeitpunkt der Entnahme. Durch verlängerte Lagerungszeit bei Raumtemperatur kommt es schnell zum Wirken abbauender Enzyme und nekrotischen Prozessen (Herold, 2016). Die Zuweisung der Leberlappen für die einzelnen Untersuchungsmethoden stellte dabei keine Schwierigkeit dar, ebenso wie die Auswertung der Blutproben und des Plasmas, da dies durch genormte Geräte durchgeführt wurde. Die Blutentnahme gestaltete sich z.T. schwierig, da sie von der Tiefe der Anästhesie, dem Blutdruck, der Herzfrequenz und dem präzisen Treffen der Blutentnahmestellen abhängig ist. Dadurch traten minimale Unterschiede in der Blutentnahmezeit auf. Da Zytokine und Blutzellen jedoch nicht innerhalb von Minuten gebildet

werden (Blum et al., 2018), sollte dies keine Auswirkungen auf die Untersuchungsergebnisse haben. Lediglich Elektrolytverschiebungen könnten dadurch entstanden sein, die jedoch nicht Bestandteil unserer Auswertung waren (Aktories et al., 2013).

Die Analyse mittels Softwareprogrammen, wie Adobe Photoshop oder ImageJ sind als relativ objektiv zu beurteilen, da sie durch einheitliche Standards bei der Erstellung von Auswertemasken und die Aufzeichnung sowie Auswertung der Schnitte randomisiert erfolgte. Generell wurde die gesamte Studie randomisiert, angefangen bei der verblindeten Zuordnung zu Kontroll- und RvD1-Gruppe, durchgeführt. Alle Auswertungen wurden anonymisiert bzw. codiert, ohne Hinweis auf eine Gruppenzuweisung, damit Rosenthal- und Verblindungseffekte ausgeschlossen werden konnten.

## 6.2 Diskussion der Ergebnisse

Forschungsergebnisse ernährungswissenschaftlicher Studien beweisen, dass eine erhöhte Zufuhr von  $\omega$ -3-Fettsäuren gesundheitsfördernd ist und vor Stoffwechselerkrankungen wie Arteriosklerose, Adipositas, Diabetes mellitus, Herzinfarkt, Schlaganfall und Lebererkrankungen schützt (Deutsche Gesellschaft für Ernährung e.V., Bonn, 2015; Weylandt et al., 2008). Da Säugetiere keine  $\omega$ -3-Fettsäuren bilden können, müssen sie mit der Nahrung aufgenommen werden (Herold, 2016; Leaf et al., 2003). *Nature* veröffentlichte im Jahr 2004 einen interessanten Artikel über das aus *C. elegans*-stammende fat-1-Gen (Kang et al., 2004) in transgenen Mäusen. Dieses codiert für den Umbau von  $\omega$ -6-Fettsäuren zu  $\omega$ -3-Fettsäuren. Die so erhöhten  $\omega$ -3-Fettsäure-Konzentrationen in den fat-1-Mäusen zeigten anti-inflammatorische und prognostisch günstigere Effekte bei verschiedensten Erkrankungen, wie z.B. Pankreatitis (Weylandt et al., 2008), Kolitis (Hudert et al., 2006), Prostata-Karzinom (Berquin et al., 2007) sowie bei akutem und chronischem Leberschaden (Schmöcker et al., 2007), HCC (Griffitts et al., 2010) und NASH (Rius et al., 2014). Die in der vorliegenden Studie untersuchten Resolvine sind Lipidmediatoren der  $\omega$ -3-Fettsäuren (siehe 3.2). In der Literatur beschriebene Eigenschaften von Resolvinen und deren Metabolite auf verschiedene Gewebe und Zelltypen (Kang und Lee, 2016; Serhan et al., 2002) sowie deren therapeutische Wirksamkeit bei unterschiedlichen Erkrankungen

(Seki et al., 2010) geben Anlass zur Untersuchung ihres therapeutischen Potentials bei chronischen Lebererkrankungen. Der in unserem Versuchsansatz durch die Gallengangs-ligatur ausgelöste Leberschaden sowie die beobachtete zunehmende Inflammation und Fibrosierung der Leber bestätigen den progredienten Verlauf der cholestatischen Lebererkrankung in diesem Tiermodell. Generell konnte hierbei jedoch durch die Gabe von RvD1 keine signifikante Verbesserung der Lebererkrankung beobachtet werden. Es zeigten sich lediglich Tendenzen, welche eine positive Wirkung des Metabolits vermuten lassen.

Ausgehend von der zentralen Rolle der Inflammation als Startpunkt im Ungleichgewicht zwischen Fibrogenese und Fibrolyse ist es nachvollziehbar, dass ein Mangel an anti-inflammatorisch wirksamen PUFAs und deren Metaboliten, zusätzlich zu dieser Dysbalance beiträgt (Neuhofer et al., 2013). Der beobachtete Anstieg aller immunologisch wirksamen Blutzellen, wie z.B. der systemischen und gewebsständigen Leukozyten, aber auch von Makrophagen und Monozyten, demonstriert eine entzündliche Gewebssituation (Blum et al., 2018). Im Gegensatz zu Friedman und Serhan (2011), welche durch die Gabe von RvD1 die Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten hemmen konnten, zeigte sich dies in unserem Versuchsansatz nicht. Seki und Schwabe (2015) beschrieben, dass Neutrophile zwar essentiell in der Vermittlung der Inflammation sind, jedoch nur eine untergeordnete Rolle in der Fibrogenese spielen. Daneben bilden Makrophagen zusammen mit den Monozyten das mononukleäre-phagozytäre System als wichtige Effektoren im Immunsystem (Blum et al., 2018). Es gibt verschiedene Makrophagen-Subtypen mit unterschiedlichen Funktionen: Derzeit sind die Typen M1- und M2a, b und c bekannt (Mareninova et al., 2015; Novak und Koh, 2013). Die M1-Subklasse wird durch IFN-, TNF- $\alpha$  und LPS aktiviert und zeichnet sich durch pro-inflammatorische Eigenschaften aus. Sie sezernieren große Mengen an Zytokinen, Chemokinen und Adhäsionsmolekülen, wie z.B. IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-12, IL-18, PDGF-bb, TNF- $\alpha$ , Stickstoff- und Sauerstoff-Radikale (Liu et al., 2012; Novak und Koh, 2013; Schuppan et al., 2001). Pro-fibrotische M1-Makrophagen produzieren ebenfalls MMPs und TIMPs und regulieren damit, zusätzlich zu den HSC, die Rekrutierung pro-inflammatorischer Zellen sowie den EZM-Umsatz (Murray und Wynn, 2011).

Dem gegenüberstehend handelt es sich bei den M2-Makrophagen um eine sehr viel hetero-

genere Gruppe mit drei Unterklassen, die Bedeutung bei der anti-Inflammation und Phagozytose haben, aber kaum Antigene präsentieren (Pannell et al., 2016). M2-Makrophagen aktivieren die Fibrolyse durch eine MMP-vermittelte EZM-Degradation. Ebenso können sie die Apoptose der HSC via TRAIL (= Tumor Necrosis Factor Related Apoptosis Inducing Ligand) induzieren (Seki und Schwabe, 2015). Aktiviert werden M2-Makrophagen durch IL-4 und IL-13. Eine starke Expression ihrerseits von TGF- $\beta$  und IL-10 ist bekannt (Novak und Koh, 2013). Zahlreiche Studien haben zudem gezeigt, dass ein Wechsel vom M1- zum M2-Phänotyp möglich ist und die einzelnen Populationen in ihrem Verhältnis zueinander sensibel auf Stoffwechselveränderungen reagieren. So äußerte sich die positive Wirkung von RvD1 auf Makrophagen in einer verstärkten Phagozytose apoptotischer Zellen und deren Umwandlung vom M1- zum M2-Phänotyp (Rius et al., 2014; Seki et al., 2010; Serhan et al., 2002; Titos et al., 2011).

Aufgrund dieses Zusammenhangs ist es interessant, die Subpopulationen der Makrophagen in unserem Versuchsansatz weiter zu untersuchen. Sowohl immunhistochemisch als auch in der mRNA-Analyse konnte eine Zunahme von F4/80-positiven Makrophagen während der Fibrosierung nachgewiesen werden. Interessanterweise waren in der RvD1-Gruppe zu allen Untersuchungszeitpunkten mehr F4/80-positive Makrophagen, wenn auch nicht signifikant, zu beobachten. Die Untersuchung des M2-Makrophagen-Markers CD206 mittels RT-PCR ergab einen leichten Anstieg zu fortgeschrittenem Untersuchungszeitpunkt, jedoch ohne Gruppenunterschiede. Im Gegensatz dazu beschrieben Kang und Lee (2016), dass RvD1 die Bildung der M2-Makrophagen-Subpopulation fördert und somit die anti-inflammatorischen Eigenschaften überwiegen. Ebenfalls konnte gezeigt werden, dass RvD1 die Leber vor Ischämie und Reperfusionsschaden durch die Aktivierung von M2-Makrophagen schützt (Kang und Lee, 2016). RvD1 bewirkte hierbei eine verminderte Ausschüttung anti-inflammatorischer Zytokine sowie eine Inhibition der Leukozyten-Infiltration (Serhan et al., 2002). Leider lieferte die Analyse der systemischen Zytokine in der hier dargestellten Studie unklare und nicht auswertbare Ergebnisse, sodass kein Rückschluss auf einen Populationswechsel der Makrophagen möglich ist.

Das Wechselspiel zwischen pro- und anti-inflammatorischen sowie -fibrotischen Zytoki-

nen ist äußerst komplex und sowohl bei der Initiation der Inflammation, der Aktivierung der HSC, der Regulation der Matrixsynthese, aber auch für die Kommunikation zwischen den Zellen von Bedeutung (Blum et al., 2018; Schmöcker et al., 2007). So vermitteln z.B. IL-1 $\beta$  und TNF- $\alpha$  die Synthese von MMPs und sorgen für einen Abbau der EZM bei gleichzeitiger Hemmung der Neusynthese (Blum et al., 2018). Demnach sind sie anti-fibrotisch wirksam. TNF- $\alpha$  wirkt zusätzlich pro-inflammatorisch, da es an der Etablierung von Entzündungskaskaden beteiligt ist (Titos et al., 2011). Beide stimulieren zudem die Apoptose von HSC (Petrasek et al., 2012). IL-6 stimuliert Proteinaseinhibitoren und TIMPs, wodurch es zur Hemmung der MMPs kommt, was letztlich zu einem Ungleichgewicht zugunsten der Fibrogenese führt (Blum et al., 2018). TGF- $\beta$  gilt als wachstumsregulierendes Zytokin. Es stimuliert die Synthese pro-fibrogener Faktoren und hemmt die Makrophagenaktivierung (Sanjabi et al., 2009). PDGF ist an verschiedenen Orten im Körper wirksam und neben der Blutgerinnung auch für Zellteilung und Proliferation von Fibroblasten zuständig (Liu et al., 2012). Diese drei Faktoren gelten als pro-fibrotische Zytokine.

IL-10 hemmt MHC-2- und Adhäsionsmoleküle (CD80) auf Makrophagen und sorgt zusammen mit TGF- $\beta$  für eine anti-inflammatorische Situation (Blum et al., 2018). IL-18 ist neben IL-12 ein wichtiges Zytokin in der Aktivierung von weiteren Immunzellen wie NK-Zellen und T-Lymphozyten (Ramakrishna et al., 2013). MCP-1 ist ein Chemokin, das chemotaktisch auf Monozyten wirkt und dementsprechend pro-inflammatorisch wirksam ist (Blum et al., 2018). Zusätzlich wirken auch IL-6 und TNF- $\alpha$  anti-inflammatorisch (Liu et al., 2012). Die mRNA-Analyse von TNF $\alpha$  ergab in der RvD1-Gruppe an Tag 2 und Tag 14, wenn auch nicht signifikant, eine Reduktion. Für TNF $\alpha$  und MCP-1 konnte ein tendenzieller Abfall der Plasmakonzentration in der RvD1-Gruppe von Tag 5 zu Tag 14 beobachtet werden, der jedoch gegenüber der Kontrollgruppe nicht signifikant war. Im Unterschied dazu zeigte IL-6 einen Anstieg in der RvD1-Gruppe zu Tag 14. Aufgrund der bereits beschriebenen positiven Effekte von RvD1 (Liu et al., 2012), ist zu vermuten, dass die mit RvD1-behandelten Tiere erniedrigte Mengen an pro-fibrogeneren bzw. erhöhte Mengen an anti-fibrogeneren Zytokinen aufweisen. Für RvD1 ist beschrieben, dass

es eine Reduktion von  $\text{TNF}\alpha$ , IL-6 und MCP-1 bewirkt (Lim et al., 2015). Wie bereits erwähnt, gestaltete sich jedoch die Auswertung des Zytokin-Assays durch die geringe Zahl an auswertbaren Proben und Konzentrationen im nicht-detektierbaren Bereich sowie hohe Standardfehler als besonders schwierig, sodass nur eingeschränkt valide und signifikante Daten erhoben werden konnten.

Hält die Inflammation an, so kommt es ebenso zu einem Umbau der Gewebestruktur. Betrachtet man noch einmal die Pathogenese der Leberfibrose, so ist das zentrale Instrument ihrer Manifestation meist die HSC (Iredale, 2001). HSC werden durch infiltrierende Immunzellen mittels Zytokine aktiviert. Dadurch werden vermehrt TIMPs exprimiert, die wiederum MMPs hemmen (Bataller und Brenner, 2005). Die so gesteigerte Fibrogenese bei gleichzeitiger Hemmung der Fibrolyse sorgt für die Zerstörung des funktionstüchtigen Parenchyms. Wie in der Einleitung beschrieben, wandern HSC durch Chemotaxis im Sinne eines *Circulus vitiosus* ein (Blum et al., 2018). Mit zunehmender Fibrosierung der Leber konnte in beiden Gruppen ein Anstieg der Proteinexpression von  $\alpha$ -SMA, als Marker für die HSC-Aktivität, beobachtet werden, welcher in der RvD1-Gruppe, wenn auch nicht signifikant, an Tag 2 und 14 geringer ausfiel. Iredale et al. (2017) beschrieben, dass die Zahl der HSC nach der Entfernung bzw. Auflösung des ätiologischen Stimulus schnell massiv absinkt, zum einen durch Apoptose, zum anderen durch Umwandlung in den ruhenden Phänotyp.

Ebenso beobachteten wir durch die RvD1-Gabe histologisch reduzierte Mengen an Kollagen-1 $\alpha$ , was jedoch auf mRNA-Ebene nicht bestätigt werden konnte. Diese Diskrepanz kann durch unterschiedliche Expressionsebenen erklärt werden: die bei der Transkription anfallende mRNA, die durch Ablesung und Umschreibung des codogenen DNA-Stranges entsteht, wird bei Translation mit Hilfe von tRNA in Proteine übersetzt (Müller et al., 2016). Dabei spielen eine Vielzahl von Initiations-, Transkriptions-, Terminations-, aber auch epigenetische Faktoren entscheidende regulierende Rollen. Das Vorhandensein einer erhöhten mRNA-Menge bei gleichzeitig nachgewiesener reduzierter Proteinmenge kann durch die Hemmung dieser Faktoren resultieren. Eine erhöhte mRNA-Menge muss demnach nicht zwangsläufig in die gleiche Proteinmenge umgeschrieben werden (Blum et al.,

2018). In einer fibrotischen Leber sind in Folge der Dysbalance zwischen Auf- und Abbau von EZM stark erhöhte Mengen an Kollagen-1 $\alpha$  nachweisbar (Bataller und Brenner, 2005). Für Resolvine wurde eine Hemmung der Fibrose durch verminderte Ablagerung von Kollagenen in Haut, Lunge und Niere zum einen mittels Aktivierung von Makrophagen und Lymphozyten, zum anderen durch direkte Hemmung von Fibroblasten beschrieben (Friedman und Serhan, 2011; Herrera et al., 2015; Seki et al., 2010). Eine positive Wirkung von RvD1 auf fibrotische Prozesse durch HSC wäre somit denkbar. Zudem demonstrierten Wanninger et al. (2012), dass HSC den Rezeptor CMKLR1 exprimieren. Ein Ligand dieses Rezeptors ist u.a. Resolvin E1, welches ebenfalls protektive und anti-inflammatorische Effekte in zahlreichen Erkrankungen zeigte (Seki et al., 2010). Resolvine der E-Gruppe bewiesen bereits in durch Schistosomiasis-Infektionen ausgelösten Leberfibrosen therapeutische Erfolge (Qiu et al., 2014).

Da die Leber einer schweren Störung unterliegt, ist die Zellproliferation kompensatorisch stark erhöht. Die gesteigerte Neubildung von Hepatozyten kann als Regulationsmechanismus betrachtet werden, um die Leberfunktion aufrecht zu erhalten. Diese Regeneration nach Schädigung des Lebergewebes wird zum einen direkt durch die Synthese von Hepatozyten, zum anderen aus Ovalzellen, die intrahepatische Stammzellen darstellen, gesichert (Blum et al., 2018). Bei höheren Säugetieren ist die Leber das einzige Organ, welches zur narbenfreien Regeneration in der Lage ist. Die Schädigung kann lange Zeit kompensiert werden, ohne dass hepatische Stoffwechselprozesse beeinträchtigt werden. Die Leberfibrose ist eine potentiell reversible Störung (Iredale et al., 2017). Bei einer massiven akuten oder chronischen Schädigung versagen jedoch die Regenerationsmechanismen, wodurch es ab einem bestimmten Schädigungsgrad zu Apoptose und Nekrose kommt. Die Nekrose wurde in unserem Versuchsansatz histologisch quantifiziert und zeigte sich innerhalb eines Untersuchungszeitraumes in z.T. sehr unterschiedlich stark ausgeprägten Nekroseflächen. Dies lässt sich durch die bereits genannten interindividuellen Unterschiede in der Dilatation der Gallenblasen erklären. So sind z.B. Tiere, welche schon bei der OP eine gefüllte Gallenblase haben (z.B. durch vorherige Nahrungskarenz des Tieres), bereits am 2. postoperativen Tag mit starken Nekroseherden zu beobachten. In der Literatur werden



ebenfalls individuelle Unterschiede im Ausmaß der Nekrosen bei BDL-operierten Tieren diskutiert (Georgiev et al., 2008). RvD1 zeigte weder auf die Proliferation von Parenchym- und Nichtparenchymzellen, noch auf das Ausmaß der Nekrosen einen signifikanten Einfluss.

Da die Ursache der Nekrose, die anhaltende Cholestase, in unserem Modell nicht beseitigt wurde, kann das System diese Schädigung nicht dauerhaft ausgleichen. Mit anhaltender Cholestase stiegen ebenfalls die Cholestaseparameter wie erwartet an. Dies bestätigt die Wirkung der BDL (Georgiev et al., 2008). Die in der RvD1-Gruppe beobachtete leicht verminderte Aktivität der AP kann ein Hinweis auf eine Verminderung des cholestatischen Schadens sein. Würde sich dieser systemisch aufrechterhalten, würde man ebenfalls eine Senkung des Bilirubin-Werts und u.U. eine Verbesserung der Leberfunktionsenzyme erwarten, was wir jedoch in der Studie nicht beobachten konnten. Es zeigte sich am 2. Tag nach BDL ein starker Anstieg der Transaminasen: wie bereits durch viele Arbeitsgruppen belegt (Abshagen et al., 2015; Georgiev et al., 2008), resultiert dies durch die Zerstörung des Parenchyms. Ein Abfall der Transaminasen könnte zum einen als Besserung des Gesundheitszustandes durch Normalisierung der Transaminasenkonzentration angesehen, zum anderen als beginnendes Leberversagen beurteilt werden (Herold, 2016). Da es zu keiner Auflösung des krankheitsauslösenden Reizes kommt, ist letzteres in Betracht zu ziehen.

Für eine Vielzahl von Substanzen, so auch für RvD1, gibt es Studien mit kontroversen Ergebnissen. Die in dieser Studie beobachteten (geringen) Effekte von RvD1 müssen kritisch betrachtet werden, denn Korrelationen beschreiben nicht zwingend Kausalitäten. Hierbei sollte die Art der Substanz, die Dosis sowie Applikationsart und -schema, das Tiermodell sowie die Untersuchungszeiträume berücksichtigt werden (siehe 6.1). Hier muss angemerkt werden, dass die Auswahl auf RvD1 fiel, da das in der Literatur bezüglich Lebererkrankungen durchaus besser untersuchte RvE1 kommerziell nicht erworben werden konnte. Die beiden Substanzen sind chemisch zwar sehr nahe verwandt (Friedman und Serhan, 2011), jedoch kann es durchaus möglich sein, dass RvE1 bei der Therapie chronischer Lebererkrankungen um ein deutliches potenter und therapeutisch wirksamer ist als RvD1.

Sie wirken über verschiedene Rezeptoren: RvD1 über GPR32, RvE1 über ChemR32, die in verschiedenen Geweben unterschiedlich stark exprimiert werden (Levy, 2012). Menon et al. (2017) zeigten, dass RvE1 bei dermalen Wundheilung und Entzündungshemmung durch neutrophile Granulozyten stärkere therapeutische Effekte aufwies. Ebenso war RvE1 bei der Hemmung von Entzündungsschmerz in der Studie von Park et al. (2011) um ein 10-faches potenter als RvD2, wohingegen RvD1 keinen Effekt zeigte. Beispiele für funktionelle Unterschiede bei starker struktureller Ähnlichkeit von Substanzen finden sich in der Medizin mehrfach. Betrachtet man beispielsweise die Steroidhormonsynthese, so wird deutlich, dass einzelne chemische Gruppen über verschiedenste Funktionen bestimmen und bei hereditären Mutationen über schwere Erbkrankheiten (z.B. Adrenogenitales Syndrom) entscheiden, obwohl diese aus der einheitlichen Grundsubstanz Cholesterin synthetisiert werden (Blum et al., 2018; Herold, 2016). Der in der Literatur beschriebene positive Effekt von RvE1 bei Schistosomiasis-induzierter Leberfibrose (Qiu et al., 2014) könnte somit auch bei cholestatischer Ätiologie denkbar sein. Andersherum sollte beachtet werden, dass RvD1 in anderen Modellen durchaus starke Wirksamkeit zeigte, aber gerade bei der aggressiven und anhaltenden Form der cholestatischen Leberfibrose nicht protektiv scheint. Zudem muss beachtet werden, dass mögliche RvD1-abhängige Effekte erst nach einer gewissen Applikationsdauer sichtbar werden. Ein verändertes Studiendesign mit Vorbehandlung der Studiengruppe mit RvD1 könnte ebenfalls die Wirksamkeit erhöhen, ist jedoch nicht von klinischer Relevanz.

### 6.3 Zusammenfassung und Ausblick

Die Inzidenz chronischer Lebererkrankungen und deren Letalität werden in Zukunft weiter ansteigen. In den Industrieländern ist dies durch vermehrten unkontrollierten Alkoholkonsum, ungesunde Ernährung und Virushepatitiden, in den Entwicklungsländern zusätzlich aufgrund unzureichender medizinischer Versorgung, fehlender Aufklärung und Armut zu erklären (Kaatsch et al., 2015; Lozano et al., 2012). Die Erforschung der molekularen Pathogenese der Leberfibrose und möglicher therapeutischer Ansätze stellen die effizienteste und nachhaltigste Lösung für das Überleben von vielen Erkrankten dar. Weitere protek-

tive Maßnahmen wären eine erweiterte Aufklärung zur Steigerung des selbstwirksamen Gesundheitsbewusstseins in puncto Alkoholkonsum, Ernährung und Adipositas sowie die Änderung im politischen Umgang mit dem Thema Organspende, z.B. durch Einführung einer Widerspruchsregelung bei der Organentnahme wie in Österreich (Eurotransplant, 2016). Zusätzlich kann die Letalität langfristig nur gesenkt und die große Nachfrage an geeigneten Transplantationsorganen und kurativen Therapien gedeckt werden, wenn die Forschung auf dem Gebiet autologer Stammzellen, durch Zucht individueller histokompatibler Gewebe oder sogar Organe und weitere Medikamentenstudien und Substanztestungen gefördert werden.

Zahlreiche Studien belegen, dass erhöhte  $\omega$ -3-Fettsäure-Konzentrationen oder ein erhöhtes Verhältnis von  $\omega$ -3-Fettsäuren zu  $\omega$ -6-Fettsäuren in der Therapie und Prophylaxe zahlreicher Erkrankungen protektiv wirken. Eine Therapie mit deren Lipidmediatoren, den Resolvinen, ist daher vielversprechend. Die bereits mehrfach beobachteten antiinflammatorischen Effekte der Resolvine im Tiermodell geben Grund zur Hoffnung, dass in weiteren Studien die Wirksamkeit dieser Substanzgruppe in Bezug auf Inflammation und Fibrogenese bestätigt wird, sodass diese zu einem Bestandteil im therapeutischen Management werden. Neben konventionellen Medikamenten wie Statinen oder ACE-Hemmern stehen auch Antioxidantien, Zytokin-Antagonisten, Pflanzeninhaltsstoffe, proteinogene Bindungspartner, Chemokin-Rezeptor-Antagonisten und TGF- $\beta$ -/PDGF-Aktivitätsblocker (Abb. 6) im Fokus aktueller Forschung anti-fibrotischer Therapeutika (Tacke et al., 2010). Ein Erfolg auf diesem Gebiet zeigte bereits der Multikinase-Inhibitor Sorafenib, der als systemische Anwendung eine deutliche Verbesserung im Überleben bei Patienten mit einem HCC und/oder Nierenzell-Karzinom in Phase-3-Studien gezeigt hat (Pinter et al., 2016). Mittlerweile stellt es ein Standardmedikament in der Therapie des Nierenzellkarzinoms und des HCC dar. Weitere innovative Angriffspunkte für die Auflösung der Inflammation stellen die TLR oder Chemokine dar (Pinter et al., 2016; Sanyal, 2015). So kann die Fibrolyse direkt durch Aktivierung von Enzymen, IGF oder CTGF stimuliert werden (Kang und Lee, 2016; Lim et al., 2015). Zur Therapie der Cholestase gibt es bereits verschiedene Versuchsreihen mit Stoffen, die meist die Neutralisierung der Gallensäuren

erzielen (Beuers et al., 2015). Salazar-Montes et al. (2015) beschreibt zudem innovative gentherapeutische Strategien, nach denen u.a. durch Applikation von Vektoren, z.B. über Viren, die Ursachen hepatischer Fibrosen therapiert werden können.

Zusätzlich ist die Verbesserung der technischen Früherkennung mit bildgebenden Verfahren und diagnostischen Methoden essentiell, um früh genug zu therapieren und das Entartungsrisiko für Krebserkrankungen günstig zu beeinflussen (Liedtke et al., 2013).

Eine weitere Vision, die angestrebt werden sollte, ist der Entwurf ethischer Tierversuchsalternativen, die den Umgang mit komplexen systemischen Prozessen exakt abbilden, schnell reproduzierbar sind und sich mit zahlreichen Variablen koppeln lassen. Einen erfolgversprechenden Ansatz dafür liefert z.B. die Studie von Gröger et al. (2017), bei der ein *liver-on-chip* einer Leber inklusive zellulärer Lebensfähigkeit, morphologischer Struktur, Metabolismus und Biotransformation nachempfunden werden konnte.

In der vorliegenden Arbeit konnte die Ausbildung einer Leberfibrose durch die Behandlung mit RvD1 nicht verhindert bzw. gemildert werden. Dennoch lassen sich in der RvD1-behandelten Gruppe protektive Effekte, auch wenn diese nicht signifikant waren, andeuten. So zeigten sich histologisch verminderte Mengen an Kollagen-1 $\alpha$ , eine geringere Proteinexpression von  $\alpha$ -SMA, geringere Werte des Cholestaseparameters AP und eine um 30 % erhöhte Makrophagenzahl am 14. Tag nach BDL.

Die Investition in die Gesamtheit der benannten Maßnahmen ist zwingend erforderlich, da nur die interdisziplinäre Zusammenarbeit all der klinischen, diagnostischen, pharmakologischen und wissenschaftlichen Bereiche nicht nur die ökonomischen Kosten des Gesundheitssystems langfristig senken kann, sondern viel mehr den Erkrankten realistische Heilungschancen nach modernstem wissenschaftlichen Standard ermöglichen. Dies ist schließlich Ziel der modernen Wissenschaft, die Entwicklung einer wirksamen, evidenzbasierten, patientenorientierten, für jeden Erkrankten zugänglichen, guten Medizin!

## 7 Thesen zur Dissertation

- Die Leberfibrose ist eine Vorstufe chronischer Lebererkrankungen wie der Leberzirrhose und dem hepatozellulären Karzinom.
- Weltweit erkranken jährlich 500.000 Menschen, in Europa sterben jedes Jahr 170.000 Menschen an den Folgen chronischer Lebererkrankungen.
- Die Inzidenz chronischer Lebererkrankungen ist in den letzten Jahrzehnten deutlich gestiegen.
- Die einzig kausale kurative Therapie ist derzeit die allogene Lebertransplantation.
- In der Pathogenese der Leberfibrose spielt die hepatische Sternzelle eine Schlüsselrolle. Durch Aktivierung einer inflammatorischen Kaskade entsteht ein Ungleichgewicht zwischen Matrixsynthese und -abbau.
- Die initiale Inflammation stellt ein geeignetes Target zur Verhinderung der Progression der Erkrankung dar.
- Erhöhte  $\omega$ -3-Fettsäure-Konzentrationen zeigten in zahlreichen Studien therapeutische und prophylaktische Effekte bei verschiedenen Erkrankungen (z.B. chronische Lebererkrankungen, Kolitis, Pankreatitis).
- Resolvine sind  $\omega$ -3-Fettsäure-Metabolite, für die anti-inflammatorische Eigenschaften bei verschiedenen Erkrankungen (z.B. Nierenfibrose, Sepsis, Peritonitis) beobachtet werden konnten.
- In dieser Studie wurde im Modell der Gallengangsligatur-(BDL)-induzierten cholestatischen Leberfibrose die Wirkung von Resolvin D1 hinsichtlich Leberschaden, Inflammation, Fibrose und Proliferation untersucht.
- Es konnten keine signifikanten Unterschiede in der inflammatorischen oder fibrotischen Situation sowie im Outcome zwischen der Resolvin D1-behandelten Versuchsgruppe und der Kontrollgruppe nachgewiesen werden. Es zeigten sich jedoch tenden-

ziell protektive Effekte in der Resolvin D1-behandelten Gruppe. So waren eine verminderte Proteinexpression von  $\alpha$ -SMA und folglich geringere Mengen an Kollagen-1 $\alpha$  nachweisbar. Auffällig war ebenso eine um 30 % erhöhte Makrophagenzahl in den RvD1-behandelten Mäusen, was auf eine Zunahme anti-inflammatorischer Makrophagen hindeuten könnte.

- Die Behandlung mit RvD1 konnte die Ausbildung einer Leberfibrose nicht verhindern oder verzögern.
- Die Ergebnisse der Studie beweisen die Komplexität der molekularen Pathophysiologie chronischer Lebererkrankungen und die Notwendigkeit der Forschung und Entwicklung weiterer wirksamer Substanzen, Forschungsmodelle und Therapieverfahren auf diesem Gebiet.

## 8 Literaturverzeichnis

### Literatur

- Abshagen, K., M. Brensel, B. Genz, K. Roth, M. Thomas, V. Fehring, U. Schaeper, und B. Vollmar (2015). Foxf1 sirna delivery to hepatic stellate cells by dbtc lipoplex formulations ameliorates fibrosis in livers of bile duct ligated mice. *Current Gene Therapy* 15(3), 215–227.
- Abshagen, K., M. König, A. Hoppe, I. Müller, M. Ebert, H. Weng, H.-G. Holzhutter, U. M. Zanger, J. Bode, B. Vollmar, M. Thomas, und S. Dooley (2015). Pathobiochemical signatures of cholestatic liver disease in bile duct ligated mice. *BMC systems biology* 9, 83.
- Abshagen, K., F. Mertens, C. Eipel, und B. Vollmar (2013). Limited therapeutic efficacy of thrombopoietin on the regeneration of steatotic livers. *International journal of clinical and experimental pathology* 6(9), 1759–1769.
- Abshagen, K., M. Senne, B. Genz, M. Thomas, und B. Vollmar (2015). Differential effects of axin2 deficiency on the fibrogenic and regenerative response in livers of bile duct-ligated mice. *European surgical research. Europäische chirurgische Forschung. Recherches chirurgicales europeennes* 55(4), 328–340.
- Aktories, K., W. Förstermann, F. B. Hofmann, und K. Starke (2013). Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie: Für Studenten der Medizin, Veterinärmedizin, Pharmazie, Chemie und Biologie sowie für Ärzte, Tierärzte und Apotheker.
- Altinbas, A., J. P. Sowa, T. Hasenberg, und A. Canbay (2015). The diagnosis and treatment of non-alcoholic fatty liver disease. *Minerva gastroenterologica e dietologica* 61(3), 159–169.
- Anthony, P., K. Ishak, N. Nayak, H. Poulsen, P. Scheuer, und L. Sobin (1978). The morphology of cirrhosis: Recommendations on definition, nomenclature, and classification

- by a working group sponsored by the world health organization. *Journal of clinical pathology* 31(5), 395–414.
- Arita, M., M. Yoshida, S. Hong, E. Tjonahen, J. N. Glickman, N. A. Petasis, R. S. Blumberg, und C. N. Serhan (2005). Resolvin e1, an endogenous lipid mediator derived from omega-3 eicosapentaenoic acid, protects against 2,4,6-trinitrobenzene sulfonic acid-induced colitis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102(21), 7671–7676.
- Arthur, M. (2000). Fibrogenesis: Metalloproteinases and their inhibitors in liver fibrosis. *American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology* 279(2), G245–9.
- Aursnes, M., J. Tungen, A. Vik, J. Dalli, und T. Hansen (2014). Stereoselective synthesis of protectin d1: a potent anti-inflammatory and proresolving lipid mediator. *Organic & biomolecular chemistry* 12(3), 432–437.
- Bannenberg, G., und C. N. Serhan (2010). Specialized pro-resolving lipid mediators in the inflammatory response: An update. *Biochimica et biophysica acta* 1801(12), 1260–1273.
- Battaller, R., und D. A. Brenner (2005). Liver fibrosis. *Journal of Clinical Investigation* 115(2), 209–218.
- Bergmann, E., und K. Horsch (2002). Kosten alkoholassoziierter Krankheiten: Schätzungen für Deutschland.
- Berquin, I. M., Y. Min, R. Wu, J. Wu, D. Perry, J. M. Cline, M. J. Thomas, T. Thornburg, G. Kulik, A. Smith, I. J. Edwards, R. D’Agostino, H. Zhang, H. Wu, J. X. Kang, und Y. Q. Chen (2007). Modulation of prostate cancer genetic risk by omega-3 and omega-6 fatty acids. *The Journal of clinical investigation* 117(7), 1866–1875.
- Bettermann, K., T. Hohensee, und J. Haybaeck (2014). Steatosis and steatohepatitis: complex disorders. *International journal of molecular sciences* 15(6), 9924–9944.



- Beuers, U., M. Trauner, P. Jansen, und R. Poupon (2015). New paradigms in the treatment of hepatic cholestasis: from udca to fxr, pxr and beyond. *Journal of Hepatology* 62(1 Suppl), S25–37.
- Biomol (2018). Product information rvd1: Cayman chemical.
- Blachier, M., H. Leleu, M. Peck-Radosavljevic, D.-C. Valla, und F. Roudot-Thoraval (2013). The burden of liver disease in europe: a review of available epidemiological data. *Journal of Hepatology* 58(3), 593–608.
- Blum, H. E., D. Müller-Wieland, und W. Siegenthaler (Eds.) (2018). *Klinische Pathophysiologie* (10., vollständig überarbeitete und erweiterte Auflage ed.). Stuttgart: Thieme.
- Chacon, A. C., B. E. Phillips, M. A. Chacon, D. Brunke-Reese, S. L. Kelleher, und D. I. Soybel (2016). Oral omega-3 fatty acids promote resolution in chemical peritonitis. *The Journal of surgical research* 206(1), 190–198.
- Chattopadhyay, R., A. M. Mani, N. K. Singh, und G. N. Rao (2018). Resolvin d1 blocks h2o2-mediated inhibitory crosstalk between shp2 and pp2a and suppresses endothelial-monocyte interactions. *Free radical biology & medicine* 117, 119–131.
- Chen, X., X. Gong, R. Jiang, B. Wang, G. Kuang, K. Li, und J. Wan (2016). Resolvin d1 attenuates ccl4-induced acute liver injury involving up-regulation of ho-1 in mice. *Immunopharmacology and immunotoxicology* 38(2), 61–67.
- Collins, P., L. Ayres, und T. Valliani (2013). Drug therapies in liver disease. *Clinical medicine (London, England)* 13(6), 585–591.
- Council, N. R. (2011). *Guide for the care and use of laboratory animals* (8th ed. ed.). Washington D.C.: National Academies Press.
- Deutsche Gesellschaft für Ernährung e.V., Bonn (Ed.) (2015). *Evidenz-basierte Leitlinie: Fettzufuhr und Prävention ernährungsmitbedingter Erkrankungen: 2. Version 2015*.

- Dropmann, A., T. Dediulia, K. Breitkopf-Heinlein, H. Korhonen, und N. M. Meindl-Beinker (2016). Tgf- $\beta$ 1 and tgf- $\beta$ 2 abundance in liver diseases of mice and men. *Oncotarget* 7(15), 19499–19518.
- Dülsner, A., R. Hack, und C. Krüger (2017). GV-SOLAS - Empfehlung zur Substanzapplikation bei Versuchstieren: Fachinformation aus dem Ausschuss für Tierschutzbeauftragte.
- Eickmeier, O., D. Fussbroich, K. Mueller, F. Serve, C. Smaczny, S. Zielen, und R. Schubert (2017). Pro-resolving lipid mediator resolvin d1 serves as a marker of lung disease in cystic fibrosis. *PloS one* 12(2), e0171249.
- Eurotransplant (2016). Yearly statistics overview eurotransplant.
- Fredman, G., L. Ozcan, S. Spolitu, J. Hellmann, M. Spite, J. Backs, und I. Tabas (2014). Resolvin d1 limits 5-lipoxygenase nuclear localization and leukotriene b4 synthesis by inhibiting a calcium-activated kinase pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 111(40), 14530–14535.
- Fried, M., M. P. Manns, G. Rogler, T. Luescher, und J. Steffel (Eds.) (2013). *Magen-Darm-Trakt*. Springer-Lehrbuch. Berlin: Springer.
- Friedman, G., und C. N. Serhan (2011). Specialized proresolving mediator targets for rve1 and rvd1 in peripheral blood and mechanisms of resolution. *The Biochemical journal* 437(2), 185–197.
- Genz, B., M. Thomas, B. M. Putzer, M. Siatkowski, G. Fuellen, B. Vollmar, und K. Abshagen (2014). Adenoviral overexpression of lhx2 attenuates cell viability but does not preserve the stem cell like phenotype of hepatic stellate cells. *Experimental cell research* 328(2), 429–443.
- Georgiev, P., W. Jochum, S. Heinrich, J. H. Jang, A. Nocito, F. Dahm, und P.-A. Clavien (2008). Characterization of time-related changes after experimental bile duct ligation. *The British journal of surgery* 95(5), 646–656.

- Goeser, T. (2013). Ikterus und cholestase - update 2013. *Falk Gastro-Kolleg, Leber und Gallenwege*.
- Gonzalez-Periz, A., R. Horrillo, N. Ferre, K. Gronert, B. Dong, E. Moran-Salvador, E. Titos, M. Martinez-Clemente, M. Lopez-Parra, V. Arroyo, und J. Claria (2009). Obesity-induced insulin resistance and hepatic steatosis are alleviated by omega-3 fatty acids: a role for resolvins and protectins. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 23(6), 1946–1957.
- Gonzalez-Periz, A., A. Planaguma, K. Gronert, R. Miquel, M. Lopez-Parra, E. Titos, R. Horrillo, N. Ferre, R. Deulofeu, V. Arroyo, J. Rodes, und J. Claria (2006). Docosahexaenoic acid (dha) blunts liver injury by conversion to protective lipid mediators: Protectin d1 and 17s-hydroxy-dha. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 20(14), 2537–2539.
- Gressner, A., E. Yagmur, und Y. Schmitt (2003). Aspekte der Pathogenese, Therapie und Diagnostik der Leberfibrose. *Laboratoriums Medizin* 27(11-12), 423–430.
- Griffitts, J., D. Saunders, Y. A. Tesiram, G. E. Reid, A. Salih, S. Liu, T. A. Lydic, J. V. Busik, J. X. Kang, und R. A. Towner (2010). Non-mammalian fat-1 gene prevents neoplasia when introduced to a mouse hepatocarcinogenesis model: Omega-3 fatty acids prevent liver neoplasia. *Biochimica et biophysica acta* 1801(10), 1133–1144.
- Gröger, M., J. Dinger, M. Kiehntopf, F. T. Peters, U. Rauen, und A. S. Mosig (2017). Preservation of cell structure, metabolism, and biotransformation activity of liver-on-chip organ models by hypothermic storage. *Advanced healthcare materials*.
- Gu, Z., G. J. Lamont, R. J. Lamont, S. M. Uriarte, H. Wang, und D. A. Scott (2016). Resolvin d1, resolvin d2 and maresin 1 activate the gsk3beta anti-inflammatory axis in tlr4-engaged human monocytes. *Innate immunity* 22(3), 186–195.
- Halade, G. V., A. Dorbane, K. A. Ingle, V. Kain, J.-M. Schmitter, und B. Rhourri-Frih (2018). Comprehensive targeted and non-targeted lipidomics analyses in failing and non-failing heart. *Analytical and bioanalytical chemistry* 410(7), 1965–1976.

- Halade, G. V., V. Kain, und C. N. Serhan (2018). Immune responsive resolvin d1 programs myocardial infarction-induced cardiorenal syndrome in heart failure. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 32(7), 3717–3729.
- Hamann, J., N. Koning, W. Pouwels, L. H. Ulfman, M. van Eijk, M. Stacey, H.-H. Lin, S. Gordon, und M. J. Kwakkenbos (2007). Emr1, the human homolog of f4/80, is an eosinophil-specific receptor. *European journal of immunology* 37(10), 2797–2802.
- Herold, G. (Ed.) (2016). *Innere Medizin 2016: Eine vorlesungsorientierte Darstellung ; unter Berücksichtigung des Gegenstandskataloges für die Ärztliche Prüfung ; mit ICD 10-Schlüssel im Text und Stichwortverzeichnis*. Köln: Selbstverl.
- Herrera, Bruno S. and Kantarci, A., A. Zarrouh, H. Hasturk, K. P. Leung, und T. E. van Dyke (2015). Lxa4 actions direct fibroblast function and wound closure. *Biochemical and biophysical research communications* 464(4), 1072–1077.
- Hillebrandt, S., C. Goos, S. Matern, und F. Lammert (2002). Genome-wide analysis of hepatic fibrosis in inbred mice identifies the susceptibility locus hfib1 on chromosome 15. *Gastroenterology* 123(6), 2041–2051.
- Hudert, C. A., K. H. Weylandt, Y. Lu, J. Wang, S. Hong, A. Dignass, C. N. Serhan, und J. X. Kang (2006). Transgenic mice rich in endogenous omega-3 fatty acids are protected from colitis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103(30), 11276–11281.
- Iredale, J. P. (2001). Hepatic stellate cell behavior during resolution of liver injury. *Seminars in liver disease* 21(3), 427–436.
- Iredale, J. P., A. Pellicoro, und J. A. Fallowfield (2017). Liver fibrosis: Understanding the dynamics of bidirectional wound repair to inform the design of markers and therapies. *Digestive diseases (Basel, Switzerland)* 35(4), 310–313.

- Ji, R., Z. Xu, G. Strichartz, und C. Serhan (2011). Emerging roles of resolvins in the resolution of inflammation and pain. *Trends in neurosciences* 34(11), 599–609.
- Kaatsch, P., C. Spix, A. Katalinic, und S. Hentschel (2015). *Krebs in Deutschland 2011/2012* (10. Ausg ed.). Beiträge zur Gesundheitsberichterstattung des Bundes. Berlin.
- Kang, J.-W., H.-S. Choi, und S.-M. Lee (2018). Resolvin d1 attenuates liver ischaemia/reperfusion injury through modulating thioredoxin 2-mediated mitochondrial quality control. *British journal of pharmacology* 175(12), 2441–2453.
- Kang, J.-W., und S.-M. Lee (2016). Resolvin d1 protects the liver from ischemia/reperfusion injury by enhancing m2 macrophage polarization and efferocytosis. *Biochimica et biophysica acta* 1861(9 Pt A), 1025–1035.
- Kang, J. X., J. Wang, L. Wu, und Z. B. Kang (2004). Fat-1 mice convert n-6 to n-3 fatty acids. *Nature* (427).
- Khan, R. A., M. R. Khan, und S. Sahreen (2012). Ccl4-induced hepatotoxicity: Protective effect of rutin on p53, cyp2e1 and the antioxidative status in rat. *BMC Complementary and Alternative Medicine* 12(1), 309.
- Kuang, H., X. Hua, J. Zhou, und R. Yang (2016). Resolvin d1 and e1 alleviate the progress of hepatitis toward liver cancer in long-term concanavalin a-induced mice through inhibition of nf-kappab activity. *Oncology reports* 35(1), 307–317.
- Leaf, A., J. X. Kang, Y.-F. Xiao, und G. E. Billman (2003). Clinical prevention of sudden cardiac death by n-3 polyunsaturated fatty acids and mechanism of prevention of arrhythmias by n-3 fish oils. *Circulation* 107(21), 2646–2652.
- Leemans, J. C., A. A. te Velde, S. Florquin, R. J. Bennink, K. de Bruin, R. A. W. van Lier, T. van der Poll, und J. Hamann (2004). The epidermal growth factor-seven transmembrane (egf-tm7) receptor cd97 is required for neutrophil migration and host defense. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 172(2), 1125–1131.

- Leenen, P. J., M. F. de Bruijn, J. S. Voerman, P. A. Campbell, und W. van Ewijk (1994). Markers of mouse macrophage development detected by monoclonal antibodies. *Journal of Immunological Methods* 174(1-2), 5–19.
- Levy, B. D. (2012). Resolvin d1 and resolvin e1 promote the resolution of allergic airway inflammation via shared and distinct molecular counter-regulatory pathways. *Frontiers in Immunology* 3.
- Levy, J., L. Montross, und N. C. Andrews (2000). Genes that modify the hemochromatosis phenotype in mice. *The Journal of clinical investigation* 105(9), 1209–1216.
- Liberal, R., und C. R. Grant (2016). Cirrhosis and autoimmune liver disease: Current understanding. *World journal of hepatology* 8(28), 1157–1168.
- Liedtke, C., T. Luedde, T. Sauerbruch, D. Scholten, K. Streetz, F. Tacke, R. Tolba, C. Trautwein, J. Trebicka, und R. Weiskirchen (2013). Experimental liver fibrosis research: update on animal models, legal issues and translational aspects. *Fibrogenesis & tissue repair* 6(1), 19.
- Lim, J. Y., C.-K. Park, und S. W. Hwang (2015). Biological roles of resolvins and related substances in the resolution of pain. *BioMed research international* 2015, 830930.
- Liu, T., X. Wang, M. A. Karsdal, D. J. Leeming, und F. Genovese (2012). Molecular serum markers of liver fibrosis. *Biomarker insights* 7, 105–117.
- Liu, Y., D. Zhou, F.-W. Long, K.-L. Chen, H.-W. Yang, Z.-Y. Lv, B. Zhou, Z.-H. Peng, X.-F. Sun, Y. Li, und Z.-G. Zhou (2016). Resolvin d1 protects against inflammation in experimental acute pancreatitis and associated lung injury. *American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology* 310(5), G303–9.
- Lörke, J., A. Ehrhardt, J. F. Lock, A. Scharfenberg, M. Malinowski, P. Neuhaus, und M. Stockmann (2007 // 2012). Nicht invasive Diagnostik der Leberzirrhose durch Messung der maximalen Leberfunktionskapazität mittels LiMAx-Test. *Deutsches Ärzteblatt* 50(01).

- Lozano, R., M. Naghavi, K. Foreman, S. Lim, A. D. Lopez, und C. J. L. Murray (2012). Global and regional mortality from 235 causes of death for 20 age groups in 1990 and 2010: A systematic analysis for the global burden of disease study 2010. *The Lancet* 380(9859), 2095–2128.
- Lukas, G., S. D. Brindle, und P. Greengard (1971). The route of absorption of intraperitoneally administered compounds. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 178(3), 562–564.
- Mani, A. M., R. Chattopadhyay, N. K. Singh, und G. N. Rao (2018). Cholesterol crystals increase vascular permeability by inactivating shp2 and disrupting adherens junctions. *Free radical biology & medicine* 123, 72–84.
- Manns, M. P. (2013). Liver cirrhosis, transplantation and organ shortage. *Deutsches Ärzteblatt international* 110(6), 83–84.
- Mareninova, O. A., M. Sendler, S. R. Malla, I. Yakubov, S. W. French, E. Tokhtaeva, O. Vagin, V. Oorschot, R. Lullmann-Rauch, J. Blanz, D. Dawson, J. Klumperman, M. M. Lerch, J. Mayerle, I. Gukovsky, und A. S. Gukovskaya (2015). Lysosome associated membrane proteins maintain pancreatic acinar cell homeostasis: Lamp-2 deficient mice develop pancreatitis. *Cellular and molecular gastroenterology and hepatology* 1(6), 678–694.
- Max-Planck-Gesellschaft, München (2017). Warum erforschen Wissenschaftler Mäuse? *Max-Planck-Gesellschaft zur Förderung der Wissenschaften e.V.*
- Mazzolini, G., J.-P. Sowa, und A. Canbay (2016). Cell death mechanisms in human chronic liver diseases: a far cry from clinical applicability. *Clinical science (London, England : 1979)* 130(23), 2121–2138.
- Menon, R., P. Krzyszczyk, und F. Berthiaume (2017). Pro-resolution potency of resolvins d1, d2 and e1 on neutrophil migration and in dermal wound healing. *Nano LIFE* 7(1).

- Müller, H.-J., D. R. Prange, und T. Röder (2016). *PCR - Polymerase-Kettenreaktion*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.
- Murray, P. J., und T. A. Wynn (2011). Protective and pathogenic functions of macrophage subsets. *Nature reviews. Immunology* 11(11), 723–737.
- Musso, G., R. Gambino, M. Cassader, E. Paschetta, und A. Sircana (2018). Specialized proresolving mediators: Enhancing nonalcoholic steatohepatitis and fibrosis resolution. *Trends in pharmacological sciences* 39(4), 387–401.
- Neuhofer, A., M. Zeyda, D. Mascher, B. K. Itariu, I. Murano, L. Leitner, E. E. Hochbrugger, P. Fraisl, S. Cinti, C. N. Serhan, und T. M. Stulnig (2013). Impaired local production of proresolving lipid mediators in obesity and 17-hdha as a potential treatment for obesity-associated inflammation. *Diabetes* 62(6), 1945–1956.
- Nobili, V., A. Alisi, G. Musso, E. Scorletti, P. C. Calder, und C. D. Byrne (2016). Omega-3 fatty acids: Mechanisms of benefit and therapeutic effects in pediatric and adult nafl. *Critical reviews in clinical laboratory sciences* 53(2), 106–120.
- Noll, S., S. Schaub-Kuhnen, und H. Höfler (Eds.) (2000). *Praxis der Immunhistochemie* (1. Aufl. ed.). München: Urban & Fischer.
- Novak, M. L., und T. J. Koh (2013). Macrophage phenotypes during tissue repair. *Journal of Leukocyte Biology* 93(6), 875–881.
- Ohashi, K., J. L. Parker, N. Ouchi, A. Higuchi, J. A. Vita, N. Gokce, A. A. Pedersen, C. Kalthoff, S. Tullin, A. Sams, R. Summer, und K. Walsh (2010). Adiponectin promotes macrophage polarization toward an anti-inflammatory phenotype. *The Journal of biological chemistry* 285(9), 6153–6160.
- Pannell, M., D. Labuz, M. O. Celik, J. Keye, A. Batra, B. Siegmund, und H. Machelska (2016). Adoptive transfer of m2 macrophages reduces neuropathic pain via opioid peptides. *Journal of neuroinflammation* 13(1), 262.



- Park, C.-K., Z.-Z. Xu, T. Liu, N. Lü, C. N. Serhan, und R.-R. Ji (2011). Resolvin d2 is a potent endogenous inhibitor for transient receptor potential subtype v1/a1, inflammatory pain, and spinal cord synaptic plasticity in mice: Distinct roles of resolvin d1, d2, and e1. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 31(50), 18433–18438.
- Pascher, A., M. Nebrig, und P. Neuhaus (2013). Irreversible liver failure: treatment by transplantation: part 3 of a series on liver cirrhosis. *Deutsches Ärzteblatt international* 110(10), 167–173.
- Petrasek, J., S. Bala, T. Csak, D. Lippai, K. Kodys, V. Menashy, M. Barrieau, S.-Y. Min, E. A. Kurt-Jones, und G. Szabo (2012). Il-1 receptor antagonist ameliorates inflammasome-dependent alcoholic steatohepatitis in mice. *The Journal of clinical investigation* 122(10), 3476–3489.
- Pinter, M., M. Trauner, M. Peck-Radosavljevic, und W. Sieghart (2016). Cancer and liver cirrhosis: implications on prognosis and management. *ESMO open* 1(2), e000042.
- Qiu, W., K. Guo, L. Yi, Y. Gong, L. Huang, und W. Zhong (2014). Resolvin e1 reduces hepatic fibrosis in mice with schistosoma japonicum infection. *Experimental and therapeutic medicine* 7(6), 1481–1485.
- Raja Gopal Reddy, M., C. Pavan Kumar, M. Mahesh, M. Sravan Kumar, und S. M. Jeyakumar (2016). Expression data on liver metabolic pathway genes and proteins. *Data in brief* 6, 625–629.
- Ramakrishna, G., A. Rastogi, N. Trehanpati, B. Sen, R. Khosla, und S. K. Sarin (2013). From cirrhosis to hepatocellular carcinoma: new molecular insights on inflammation and cellular senescence. *Liver cancer* 2(3-4), 367–383.
- Rassow, J. (2012). *Biochemie: 67 Tabellen* (3., vollst. überarbeitete und erweiterte Auflage ed.). Duale Reihe. Stuttgart: Thieme.

- Recchiuti, A., M. Codagnone, A. M. Pierdomenico, C. Rossi, V. C. Mari, E. Ciani, F. Simiele, V. Gatta, und M. Romano (2014). Immunoresolving actions of oral resolvin d1 include selective regulation of the transcription machinery in resolution-phase mouse macrophages. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 28(7), 3090–3102.
- Reetz, J., B. Genz, C. Meier, B. S. Kowtharapu, F. Timm, B. Vollmar, O. Herchenroder, K. Abshagen, und B. M. Putzer (2013). Development of adenoviral delivery systems to target hepatic stellate cells in vivo. *PloS one* 8(6), e67091.
- Rius, B., E. Titos, E. Moran-Salvador, C. Lopez-Vicario, V. Garcia-Alonso, A. Gonzalez-Periz, V. Arroyo, und J. Claria (2014). Resolvin d1 primes the resolution process initiated by calorie restriction in obesity-induced steatohepatitis. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 28(2), 836–848.
- Robert Koch Institut RKI (2015). Gesundheit in Deutschland: Gesundheitsberichterstattung des Bundes gemeinsam getragen von RKI und DESTATIS.
- Roeb, E., H. Steffen, H. Bantel, und B. U. (2015). Nicht-alkoholische Fettlebererkrankungen: AWMF-Leitlinie Register Nr. 021-025.
- Rowell, R. J., und Q. M. Anstee (2015). An overview of the genetics, mechanisms and management of nafld and ald. *Clinical medicine (London, England)* 15 Suppl 6, s77–82.
- Rozga, J., A. Foss, und J. Alumets (1991). Liver cirrhosis in rats: regeneration and assessment of the role of phenobarbital.
- Russo, T. V. (2013). Differentiation of m1- or m2-macrophages from pbmc/monocytes // application note.
- Safari, S., M. Motavaf, S. Seyed Siamdoust, A. Alireza, und M. Seyed (2014). Hepatotoxicity of halogenated inhalational anesthetics. *Iranian Red Crescent Medical Journal* 16(9).

- Salazar-Montes, A. M., L. D. Hernandez-Ortega, M. S. Lucano-Landeros, und J. Armendariz-Borunda (2015). New gene therapy strategies for hepatic fibrosis. *World journal of gastroenterology* 21(13), 3813–3825.
- Sanjabi, S., L. A. Zenewicz, M. Kamanaka, und R. A. Flavell (2009). Anti-inflammatory and pro-inflammatory roles of tgf-beta, il-10, and il-22 in immunity and autoimmunity. *Current opinion in pharmacology* 9(4), 447–453.
- Sanyal, A. J. (2015). Novel therapeutic targets for steatohepatitis. *Clinics and research in hepatology and gastroenterology* 39 Suppl 1, S46–50.
- Sauerbruch, T., B. Appenrodt, V. Schmitz, und U. Spengler (2013). The conservative and interventional treatment of the complications of liver cirrhosis: Part 2 of a series on liver cirrhosis. *Deutsches Arzteblatt international* (8), 126–32, I.
- Schmöcker, C., K. H. Weylandt, L. Kahlke, J. Wang, H. Lobeck, G. Tiegs, T. Berg, und J. X. Kang (2007). Omega-3 fatty acids alleviate chemically induced acute hepatitis by suppression of cytokines. *Hepatology (Baltimore, Md.)* 45(4), 864–869.
- Schrier, D. J., R. G. Kunkel, und S. H. Phan (1983). The role of strain variation in murine bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *The American review of respiratory disease* 127(1), 63–66.
- Schroder, K., und J. Tschopp (2010). The inflammasomes. *Cell* 140(6), 821–832.
- Schroder, K., J. Tschopp, und R. Zhou (2010). The nlrp3 inflammasome: A sensor for metabolic danger? *Science (New York, N.Y.)* 327(5963), 296–300.
- Schünke, M., E. Schulte, U. Schumacher, M. Voll, und K. Wesker (2012). *Innere Organe: 121 Tabellen* (3., überarb. und erw. Aufl. ed.), Volume Lernatlas der Anatomie / Michael Schünke; Erik Schulte; Udo Schumacher. Ill. von Markus Voll; Karl Wesker of *Prometheus*. Stuttgart: Thieme.
- Schuppan, D., M. Ruehl, R. Somasundaram, und E. G. Hahn (2001). Matrix as a modulator of hepatic fibrogenesis. *Seminars in liver disease* 21(3), 351–372.

- Schutte, K., C. Schulz, und P. Malfertheiner (2016). Nutrition and hepatocellular cancer. *Gastrointestinal tumors* 2(4), 188–194.
- Seki, E., und R. F. Schwabe (2015). Hepatic inflammation and fibrosis: functional links and key pathways. *Hepatology (Baltimore, Md.)* 61(3), 1066–1079.
- Seki, H., T. Sasaki, T. Ueda, und M. Arita (2010). Resolvins as regulators of the immune system. *TheScientificWorldJournal* 10, 818–831.
- Serhan, C. N. (2010). Novel lipid mediators and resolution mechanisms in acute inflammation: to resolve or not? *The American journal of pathology* 177(4), 1576–1591.
- Serhan, C. N., S. Hong, K. Gronert, S. P. Colgan, P. R. Devchand, G. Mirick, und R.-L. Moussignac (2002). Resolvins. *The Journal of Experimental Medicine* 196(8), 1025–1037.
- Shimada, M., E. Hashimoto, M. Tanai, K. Hasegawa, H. Okuda, N. Hayashi, K. Takasaki, und J. Ludwig (2002). Hepatocellular carcinoma in patients with non-alcoholic steatohepatitis. *Journal of Hepatology* 37(1), 154–160.
- Stout, R. D., C. Jiang, B. Matta, I. Tietzel, S. K. Watkins, und J. Suttles (2005). Macrophages sequentially change their functional phenotype in response to changes in microenvironmental influences. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 175(1), 342–349.
- Stout, R. D., und J. Suttles (2004). Functional plasticity of macrophages: reversible adaptation to changing microenvironments. *Journal of leukocyte biology* 76(3), 509–513.
- Tacke, F., R. Weiskirchen, H. Haller, und G. W.L. (2010). Pathophysiologie der Leberfibrose: Aktuelle Aspekte und neue Ansätze für antifibrotische Therapien. *Der Internist* 51(1), 21–29.
- Tag, C. G., S. Sauer-Lehnen, S. Weiskirchen, E. Borkham-Kamphorst, R. H. Tolba, F. Tacke, und R. Weiskirchen (2015). Bile duct ligation in mice: induction of inflammatory

- liver injury and fibrosis by obstructive cholestasis. *Journal of visualized experiments : JoVE* (96).
- Takahashi, H. (Ed.) (2011). *Liver Biopsy*.
- Taylor, B. K. (2015). Resolvin d1: A new path to unleash the analgesic potential of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma for postoperative pain in patients with diabetes. *Anesthesiology* 123(6), 1231–1232.
- Titos, E., B. Rius, A. Gonzalez-Periz, C. Lopez-Vicario, E. Moran-Salvador, M. Martinez-Clemente, V. Arroyo, und J. Claria (2011). Resolvin d1 and its precursor docosahexaenoic acid promote resolution of adipose tissue inflammation by eliciting macrophage polarization toward an m2-like phenotype. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 187(10), 5408–5418.
- Tradtrantip, L., und A. S. Verkman (2016). Aquaporin gene therapy for disorders of cholestasis? *Hepatology (Baltimore, Md.)* 64(2), 344–346.
- Wang, B., C. Hu, Y. Mei, J. Bao, S. Ding, X. Liu, Q. Mei, und J. Xu (2018). Resolvin d1 resolve inflammation in experimental acute pancreatitis by restoring autophagic flux. *Digestive diseases and sciences*.
- Wanninger, J., S. Bauer, K. Eisinger, T. S. Weiss, R. Walter, C. Hellerbrand, A. Schaffler, A. Higuchi, K. Walsh, und C. Buechler (2012). Adiponectin upregulates hepatocyte cm-klr1 which is reduced in human fatty liver. *Molecular and cellular endocrinology* 349(2), 248–254.
- Wasmuth, H. E., C. Trautwein, H. Haller, und W. Gross (2010). Leberfibrose: Klinik, Diagnostik und Management. *Der Internist* 51(1), 14–20.
- Wei, Q., K. Mu, T. Li, Y. Zhang, Z. Yang, X. Jia, W. Zhao, W. Huai, P. Guo, und L. Han (2014). Deregulation of the nlrp3 inflammasome in hepatic parenchymal cells during liver cancer progression. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* 94(1), 52–62.

- Weiskirchen, R., und F. Tacke (2014). Cellular and molecular functions of hepatic stellate cells in inflammatory responses and liver immunology. *Hepatobiliary surgery and nutrition* 3(6), 344–363.
- Weylandt, K. H., L. F. Krause, B. Gomolka, C.-Y. Chiu, S. Bilal, A. Nadolny, S. F. Waechter, A. Fischer, M. Rothe, und J. X. Kang (2011). Suppressed liver tumorigenesis in fat-1 mice with elevated omega-3 fatty acids is associated with increased omega-3 derived lipid mediators and reduced tnfr-alpha. *Carcinogenesis* 32(6), 897–903.
- Weylandt, K. H., A. Nadolny, L. Kahlke, T. Kohnke, C. Schmocker, J. Wang, G. Y. Lauwers, J. N. Glickman, und J. X. Kang (2008). Reduction of inflammation and chronic tissue damage by omega-3 fatty acids in fat-1 transgenic mice with pancreatitis. *Biochimica et biophysica acta* 1782(11), 634–641.
- Wiegand, J., und T. Berg (2013). The etiology, diagnosis and prevention of liver cirrhosis: part 1 of a series on liver cirrhosis. *Deutsches Arzteblatt international* 110(6), 85–91.
- Winkler, S., E. Borkham-Kamphorst, P. Stock, S. Brückner, M. Dollinger, R. Weiskirchen, und B. Christ (2014). Human mesenchymal stem cells towards non-alcoholic steatohepatitis in an immunodeficient mouse model. *Experimental cell research* 326(2), 230–239.
- Wree, A., A. Eguchi, M. D. McGeough, C. A. Pena, C. D. Johnson, A. Canbay, H. M. Hoffman, und A. E. Feldstein (2014). Nlrp3 inflammasome activation results in hepatocyte pyroptosis, liver inflammation, and fibrosis in mice. *Hepatology (Baltimore, Md.)* 59(3), 898–910.
- Xu, Z.-Z., L. Zhang, T. Liu, J. Y. Park, T. Berta, R. Yang, C. N. Serhan, und R.-R. Ji (2010). Resolvins rve1 and rvd1 attenuate inflammatory pain via central and peripheral actions. *Nature medicine* 16(5), 592–7, 1p following 597.
- Zazueta, C., M. Buelna-Chontal, A. Macías-López, N. G. Román-Anguiano, H. González-Pacheco, N. Pavón, R. Springall, A. Aranda-Frausto, R. Bojalil, A. Silva-Palacios,

- R. Velázquez-Espejel, S. Galvan Arzate, und F. Correa (2018). Cdp-choline protects liver from ischemia/reperfusion injury preserving mitochondrial function and reducing oxidative stress. *Liver transplantation : official publication of the American Association for the Study of Liver Diseases and the International Liver Transplantation Society*.
- Zhang, L., N. Terrando, Z.-Z. Xu, S. Bang, S.-E. Jordt, W. Maixner, C. N. Serhan, und R.-R. Ji (2018). Distinct analgesic actions of dha and dha-derived specialized pro-resolving mediators on post-operative pain after bone fracture in mice. *Frontiers in pharmacology* 9, 412.
- Zhang, T., H.-H. Shu, L. Chang, F. Ye, K.-Q. Xu, und W.-Q. Huang (2015). Resolvin d1 protects against hepatic ischemia/reperfusion injury in rats. *International immunopharmacology* 28(1), 322–327.
- Zhao, Y.-L., L. Zhang, Y.-Y. Yang, Y. Tang, J.-J. Zhou, Y.-Y. Feng, T.-L. Cui, F. Liu, und P. Fu (2016). Resolvin d1 protects lipopolysaccharide-induced acute kidney injury by down-regulating nuclear factor-kappa b signal and inhibiting apoptosis. *Chinese medical journal* 129(9), 1100–1107.
- Zhou, R., A. S. Yazdi, P. Menu, und J. Tschopp (2011). A role for mitochondria in nlrp3 inflammasome activation. *Nature* 469(7329), 221–225.
- Zhuo, Y., S. Zhang, C. Li, L. Yang, H. Gao, und X. Wang (2018). Resolvin d1 promotes sirt1 expression to counteract the activation of stat3 and nf-kb in mice with septic-associated lung injury. *Inflammation*.

## 9 Abbildungsverzeichnis

### Abbildungsverzeichnis

1	Anatomie der Gallengänge (Schünke et al., 2012) . . . . .	5
2	Makroskopisch A) gesunde Leber, B) zirrhotische Leber, Mikroskopisch C) gesundes Lebergewebe, D) zirrhotisches Lebergewebe (Quelle: <a href="http://www.medizin350.uni-kiel.de/entwurf/kupffer_komplettkupffer_entdeckungen.html">http://www.medizin350.uni-kiel.de/entwurf/kupffer_komplettkupffer_entdeckungen.html</a> , 21.02.2018) . . . . .	6
3	Weltweite Todesursachen für Menschen zwischen 15-49 Jahren (Lozano et al., 2012)	8
4	a) Leberkrebs - Altersstandardisierte Erkrankungs- und Sterberaten (je 100.000), b) Leberkrebs - Absolute Zahl der Neuerkrankungs- und Sterbefälle, je nach Geschlecht, ICD-10 C22, Deutschland 1999-2012 (Kaatsch et al., 2015) . . . . .	9
5	Pathophysiologie der Leberfibrose (Liu et al., 2012) . . . . .	15
6	Potentielle Therapieansätze bei Leberfibrose (Tacke et al., 2010) . . . . .	19
7	Synthese und Eigenschaften anti-inflammatorischer Mediatoren (Serhan, 2010) .	21
8	a) OP-Arbeitsplatz, b) Ligatur des Ductus choledochus . . . . .	25
9	Versuchsaufbau . . . . .	26
10	Anatomie der Leberlappen der Maus (ll = linker, rl = rechter, ml = mittlerer Lappen, cl = Lobus caudatus) (Tag et al., 2015) . . . . .	28
11	Aufbau des Semi-Dry-Blots . . . . .	36
12	a) Anzahl der Monozyten, Basophilen, Eosinophilen und b) Anzahl der Thrombozyten der Kontrollgruppe (K) und RvD1-behandelten Versuchsgruppe (RvD1) 2, 5 und 14 Tage nach BDL. Mittelwert $\pm$ SEM (n=10 pro Gruppe und Zeitpunkt). One way ANOVA; *p < 0,05 . . . . .	41
13	Plasmaaktivitäten von a) GLDH und b) AP der Kontrollgruppe (K) und der RvD1-behandelten Gruppe (RvD1) 2, 5 und 14 Tage nach BDL. Mittelwert $\pm$ SEM (n=10 pro Gruppe und Zeitpunkt). One way ANOVA; *p < 0,05 . . . . .	43
14	Repräsentative Bilder der H.E.-gefärbten Leberschnitte der Kontrollgruppe (K) und RvD1-behandelten Versuchsgruppe (RvD1) 5 und 14 Tage nach BDL, Vergrößerung: 100x . . . . .	45



- 
- 15 Zahl der systemischen Leukozyten [ $10^9/l$ ] der Kontrollgruppe (K) und RvD1-behandelten Versuchsgruppe (RvD1) 2, 5 und 14 Tage nach BDL. Mittelwert  $\pm$  SEM (n=10 pro Gruppe und Zeitpunkt). One way ANOVA; \*p < 0,05 . . . . . 46
- 16 a) Anzahl CAE-positiver Zellen in Leberschnitten der Kontrollgruppe (K) und RvD1-behandelten Versuchsgruppe (RvD1) 2, 5 und 14 Tage nach BDL. Mittelwert  $\pm$  SEM (n=10 pro Gruppe und Zeitpunkt). One way ANOVA; \*p < 0,05  
b) Repräsentative Bilder CAE-gefärbter Leberschnitte der Kontrollgruppe (K) und RvD1-behandelten Versuchsgruppe (RvD1) 5 und 14 Tage nach BDL, Vergrößerung: 400x . . . . . 47
- 17 a) Anzahl F4/80-positiver Zellen in Leberschnitten der Kontrollgruppe (K) und RvD1-behandelten Versuchsgruppe (RvD1) 2, 5 und 14 Tage nach BDL. Mittelwert  $\pm$  SEM (n=10 pro Gruppe und Zeitpunkt). One way ANOVA; \*p < 0,05  
b) Repräsentative Bilder F4/80-gefärbter Leberschnitte der Kontrollgruppe (K) und RvD1-behandelten Versuchsgruppe (RvD1) 5 und 14 Tage nach BDL, Vergrößerung: 400x . . . . . 48
- 18 Relative hepatische mRNA-Expression von a) F4/80 und b) CD206 in der Kontrollgruppe (K) und RvD1-behandelten Versuchsgruppe (RvD1) 2, 5 und 14 Tage nach BDL. Die mRNA-Expression wurde auf die Expression des Housekeepinggens GAPDH relativiert. Mittelwert  $\pm$  SEM (n=10 pro Gruppe und Zeitpunkt). One way ANOVA; \*p < 0,05 . . . . . 48
- 19 Plasmakonzentrationen von a) MCP-1, b) TGF- $\beta$ , der Kontrollgruppe (K) und RvD1-behandelten Versuchsgruppe (RvD1) 2, 5 und 14 Tage nach BDL. Mittelwert  $\pm$  SEM (n=10 pro Gruppe und Zeitpunkt). One way ANOVA; \*p < 0,05 . . . . . 49
- 20 Relative hepatische mRNA-Expression von TNF- $\alpha$  in der Kontrollgruppe (K) und RvD1-behandelten Versuchsgruppe (RvD1) 2, 5 und 14 Tage nach BDL. Die mRNA-Expression von TNF- $\alpha$  wurde auf die Expression des Housekeepinggens GAPDH relativiert. Mittelwert  $\pm$  SEM (n=10 pro Gruppe und Zeitpunkt). One way ANOVA; \*p < 0,05 . . . . . 49

21	a) Kollagen-1 $\alpha$ -positive Fläche [%] im Lebergewebe der Kontrollgruppe (K) und RvD1-behandelten Versuchsgruppe (RvD1) 2, 5 und 14 Tage nach BDL. Mittelwert $\pm$ SEM (n=10 pro Gruppe und Zeitpunkt). One way ANOVA; *p < 0,05 b) Repräsentative Bilder der Kollagen-1 $\alpha$ -Immunhistochemie im Lebergewebe der Kontrollgruppe (K) und RvD1-behandelten Versuchsgruppe (RvD1) 2 und 14 Tage nach BDL, Vergrößerung: 100x . . . . .	52
22	a) Relative hepatische mRNA-Expression von Kollagen-1 $\alpha$ in der Kontrollgruppe (K) und RvD1-behandelten Versuchsgruppe (RvD1) 2, 5 und 14 Tage nach BDL. Die mRNA-Expression von Kollagen-1 $\alpha$ wurde auf die Expression des Housekeepinggens GAPDH relativiert. Mittelwert $\pm$ SEM (n=10 pro Gruppe und Zeitpunkt). One way ANOVA; *p < 0,05 b) Relative hepatische Proteinexpression von $\alpha$ -SMA in der Kontrollgruppe (K) und RvD1-behandelten Versuchsgruppe (RvD1) 2, 5 und 14 Tage nach BDL. Die Protein-Expression von $\alpha$ -SMA wurde auf die Expression des Housekeepinggens GAPDH relativiert. Mittelwert $\pm$ SEM (n=10 pro Gruppe und Zeitpunkt). One way ANOVA; *p < 0,05 . . . . .	53
23	a) Sirius-red-positive Fläche [%] der Kontrollgruppe (K) und RvD1-behandelten Versuchsgruppe (RvD1) 2, 5 und 14 Tage nach BDL. Mittelwert $\pm$ SEM (n=10 pro Gruppe und Zeitpunkt). One way ANOVA; *p < 0,05 b) Repräsentative Bilder Sirius-red-positiver Leberschnitte der Kontrollgruppe (K) und RvD1-behandelten Versuchsgruppe (RvD1) 5 und 14 Tage nach BDL, Vergrößerung: 100x . . . . .	54
24	Plasmakonzentrationen von a) TGF- $\beta$ , b) TNF- $\alpha$ , der Kontrollgruppe (K) und RvD1-behandelten Versuchsgruppe (RvD1) 2, 5 und 14 Tage nach BDL. Mittelwert $\pm$ SEM (n=10 pro Gruppe und Zeitpunkt). One way ANOVA; *p < 0,05 . . . . .	54
25	Repräsentative Bilder BrdU-positiver Leberschnitte der Kontrollgruppe (K) und RvD1-behandelten Versuchsgruppe (RvD1) 2 und 14 Tage nach BDL, Vergrößerung: 400x . . . . .	55
26	Anzahl BrdU-positiver a) Hepatozyten und b) Nicht-Parenchymzellen in der Kontrollgruppe (K) und RvD1-behandelten Versuchsgruppe (RvD1) 2, 5 und 14 Tage nach BDL. Mittelwert $\pm$ SEM (n=10 pro Gruppe und Zeitpunkt). One way ANOVA; *p < 0,05 . . . . .	56
27	Forschungsmodelle der Leberfibrose (Liedtke et al., 2013) . . . . .	59

## 10 Tabellenverzeichnis

### Tabellenverzeichnis

1	Pharmakokinetik von Resolvin D1 (Recchiuti et al., 2014) . . . . .	20
2	Zusammensetzung Trenngel . . . . .	34
3	Zusammensetzung Sammelgel . . . . .	34
4	Anodenpuffer I (pH 10,4) . . . . .	35
5	Anodenpuffer II (pH 10,4) . . . . .	35
6	Kathodenpuffer (pH 9,4) . . . . .	35
7	Denaturierungsansatz . . . . .	37
8	cDNA-Synthese-Mastermix . . . . .	37
9	Primersequenzen der RT-PCR . . . . .	38
10	Vollblutanalyse (MW $\pm$ SEM, n=10 pro Gruppe und Zeitpunkt)[WBC = Leukozyten, RBC = Erythrozyten, PLT = Thrombozyten, HGB = Hämoglobingehalt, LYM# = Lymphozyten, MXD# = Summe aus Monozyten, Basophile, Eosinophile, physiologische Werte von Charles-River-Laboratories, 2012] One way ANOVA; p < 0,05 # vs. K 14d, p < 0,05 * vs. Rv 14d . . . . .	42
11	Plasmaanalyse (MW $\pm$ SEM, n=10 pro Gruppe und Zeitpunkt)[ALT = Alanin-Aminotransferase, AP = Alkalische Phosphatase, AST = Aspartat-Aminotransferase, Bili = direktes Bilirubin, GLDH = Glutamat-Dehydrogenase, physiologische Werte von Charles-River-Laboratories, 2012] Signifikanzen One way ANOVA; p < 0,05 # vs. K 14d, p < 0,05 * vs. Rv 14d . . . . .	44
12	Multiplex-Zytokin-ELISA (MW $\pm$ SEM, n=2-3 pro Gruppe und Zeitpunkt)[IL = Interleukin, MCP = Monocyte Chemoattractant Protein , TNF = Tumornekrosefaktor, PDGF-bb = Platelet Derived Growth Factor , TGF = Tumor Growth Factor, Referenz aus gesunden Balb/c-Kontrolltieren], keine Signifikanzen aufgrund geringer Zahl an auswertbaren Proben . . . . .	50

## 11 Danksagung

Ich danke meiner Doktormutter Frau Prof. Dr. med. Brigitte Vollmar für die Bereitstellung des Dissertationsthemas und die Möglichkeit meine Promotion studiumsbegleitend am Rudolf-Zenker-Institut für Experimentelle Chirurgie absolvieren zu dürfen. Durch ihre Unterstützung und konstruktive Kritik trug sie entscheidend zum Gelingen dieser Arbeit bei.

Ganz besonderer Dank gilt meiner Betreuerin Frau Dr. rer. nat. Kerstin Abshagen für die hervorragende Betreuung, die Motivation, Geduld und Zuversicht eine erfolgreiche Dissertation hervorzubringen, die stets offene Tür, das Engagement und die schnelle, konstruktive Hilfe meine Arbeit noch während meiner Studienzeit abschließen zu können.

Desweiteren bedanke ich mich herzlich bei dem ganzen Team des Rudolf-Zenker-Instituts für Experimentelle Chirurgie für die Unterstützung. Ein großer Dank geht dabei an Frau Berit Blendow, Frau Dorothea Frenz, Frau Maren Nerowski sowie Frau Eva Lorbeer für die technische Assistenz im Rahmen der Versuchsreihen.

Ein ganz besonderer Dank gilt auch meinen Eltern. Durch ihre liebevolle, engagierte und tolerante Art waren sie mir in jeder Phase meines Lebens eine wichtige Stütze und haben mir somit erst den Weg für das Studium und damit auch für die vorliegende Dissertation geebnet. Ebenso möchte ich mich bei meiner Freundin Stefanie, meiner Schwester Franziska, meinem Freund Marcus, meiner Familie und Freunden für das immer offene Ohr sowie ihre aufmunternden und motivierenden Worte bedanken.

Vielen Dank!

## 12 Lebenslauf

### Persönliche Daten

Name	Alexander Hartmann
Geburtsdatum	27.02.1990
Geburtsort	Berlin
Familienstand	ledig
Anschrift	Waldemarstraße 37, 18057 Rostock

### Ausbildung

10/2012	Studium der Humanmedizin, Universität Rostock
bis	Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung, Herbst 2014
12/2018	Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung, Herbst 2017
	Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung, Herbst 2018
11/2017	Praktisches Jahr
bis	1. Tertial: St. Georg Klinik Leipzig - Innere Medizin
10/2018	2. Tertial: Klinikum Braunschweig - Chirurgie
	3. Tertial: Universitätsklinikum Rostock - Kinderheilkunde
10/2009	Studium der Biowissenschaften mit Erwerb des Bachelor of Science
bis	„Die Rolle von Muskarinrezeptoren bei hippocampaler Epilepsie“
09/2012	Institut für Physiologie, Universitätsmedizin Rostock
06/2009	Abitur, Johann-Gottfried-Herder-Gymnasium, Berlin-Lichtenberg

### Promotion

01/2015	Rudolf-Zenker-Institut für Experimentelle Chirurgie
bis	Universitätsmedizin Rostock
12/2018	“Analyse des therapeutischen Potentials von Resolvin D1 im murinen Modell der cholestatischen Leberfibrose“

## 13 Eidestattliche Erklärung

Ich erkläre an Eides statt, dass die vorliegende Arbeit mit dem Titel „Analyse des therapeutischen Potentials von Resolvin D1 im murinen Modell der cholestatischen Leberfibrose“ von mir selbstständig und nur unter Benutzung der angegebenen Quellen und Hilfsmittel erstellt worden ist. Die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen sind als solche kenntlich gemacht.

Ich versichere weiterhin, dass diese Arbeit nicht vorher und auch nicht gleichzeitig bei einer anderen als der Medizinischen Fakultät der Universität Rostock zur Eröffnung eines Promotionsverfahrens eingereicht worden ist.

Rostock, 2018

Alexander Hartmann

